154

Philippe de MICCO
Assistant à la Faculté de Médecine

CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'AGGLUTINABILITE CELLULAIRE PAR DES LECTINES AU COURS DU CYCLE DU VIRUS POLYOME

MARSEILLE - 1972

FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE

CONTRIBUTION
A L'ETUDE DE L'AGGLUTINABILITE CELLULAIRE PAR DES LECTINES AU COURS DU CYCLE DU VIRUS POLYOME

THÈSE

présentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Médecine de MARSEILLE

LE 19 JUIN 1972

par

Monsieur Philippe de MICCO

né le 30 Août 1947, à ALGER

Assistant à la Faculté de Médecine

pour obtenir le Grade de DOCTEUR EN MEDECINE.

Examinateurs de la thèse	M. le Professeur	J. TAMALET	Président
	MM. les Professeurs	P. GEVAUDAN	Assesseurs
		R. DEPIEDS	
		H. BONNEAU	
		J. SENEZ	

Nom et Adresse de l'Editeur :

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE DE MEDECINE DE MARSEILLE

Personnel Administratif

DOYEN

H. ROUX

Doyens Honoraires

G. MORIN - H. GASTAUT

Assesseurs

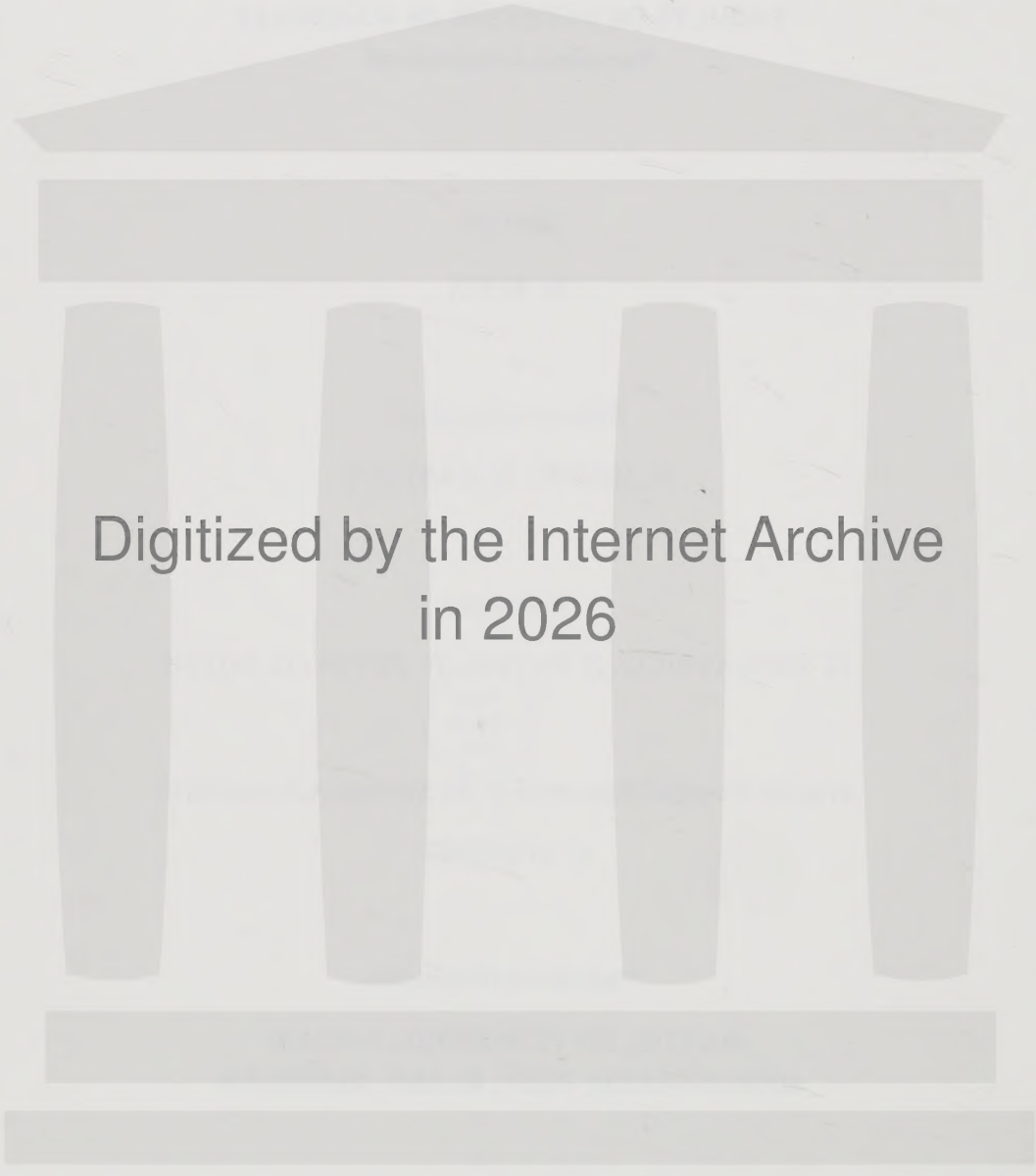
G. SERRATRICE - H. PAYAN - R. DEVIN - G. COTTE

Attaché Principal Responsable des Services Administratifs

P. MOUCHET

Professeurs Honoraires

MATTEI, DE VERNEJOUL, GIRAUD,
MARONNEAUD, PIERI, BLANC, MOSINGER.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547004_0021

PERSONNEL ENSEIGNANT

Professeurs titulaires

MM.	APPAIX	Clinique Oto-Rhino-Laryngologie
	AUDIER	Clinique Médicale B et Gérontologie
	BERNARD R.	Clinique Médicale Infantile
	BOUDOURESQUES	Clinique de Neurologie
	BOUYARD	Pharmacologie
	BRAHIC	Bactériologie et Virologie
	CARCASSONNE F.	Clinique Chirurgicale
	CARCASSONNE M.	Chirurgie Pédiatrique
	CHARPIN	Clinique Pneumo-Phtisiologique
	CORRIOL	Physiologie
	DEPIEDS	Immunologie
	DERRIEN	Chimie Biologique
	DESANTI	Médecine Sociale
	DEVIN	Séméiologie Chirurgicale
	DONNET	Médecine Expérimentale
	DOR	Clinique de Chirurgie Thoracique
	DUBOULOZ	Physique
	DUCASSOU	Clinique Urologique
	FARNARIER	Ophtalmologie
	GASTAUT	Anatomie Pathologique
	GERARD	Thérapeutique
	GRANJON	Pathologie Chirurgicale
	GRISOLI	Anatomie
	HADIDA	Clinique Dermatologique
	HENRY	Anatomie appliquée et Chirurgie Expérimentale
	HOUEL	Chirurgie thoracique et Chirurgie du coeur
	IMBERT	Chirurgie Générale
	JAYLE	Clinique Ophtalmologique
	JOUVE	Clinique Cardiologique et Cardiologie Expérimentale

MM. JULLIEN ..... Médecine Légale et Médecine du Travail
LACHARD ..... Clinique Stomatologique
LAFFARGUE ..... Anatomie Pathologique
LAMY ..... Clinique Chirurgicale
LAVAL ..... Physiopathologie des voies respiratoires
LEGRE ..... Electroradiologie
LENA ..... Clinique Chirurgicale C Générale et Vasculaire
LISSITZKY ..... Biochimie Médicale
MONGES H. ..... Clinique des maladies des voies digestives et de la nutrition
MONGIN ..... Séméiologie Médicale
MORIN ..... Physiologie
MOUREN ..... Pathologie Interne
N ..... Clinique Médicale Thérapeutique et des maladies du sang
ORSINI ..... Pédiatrie
PAILLAS ..... Clinique neuro-chirurgicale
PAYAN ..... Anatomie Pathologique
PENE ..... Clinique exotique
PICARD ..... Histologie et Embryologie
RANQUE ..... Parasitologie
RAYBAUD ..... Clinique des maladies infectieuses
RECORDIER ..... Clinique Rhumatologique
ROUX ..... Physique Médicale
SALMON ..... Clinique Chirurgicale Infantile et Orthopédique
SARLES ..... Gastro-Entérologie
SAUTET ..... Hygiène et Médecine Sociale
SERAFINO ..... Clinique et Epidémiologie des cancers
SERMENT ..... Clinique Obstétricale et Gynécologique
SIMONIN ..... Clinique Médicale
STAHL ..... Histologie et Embryologie
SUTTER ..... Clinique Psychiatrique
TAMALET ..... Microbiologie
TEMIME ..... Dermato-Vénéréologie

MM. TISSIE ..... Oto-Rhino-Laryngologie
TOGA ..... Anatomie Pathologique - Neuro-Pathologie
TRIFAUD ..... Clinique Chirurgicale Orthopédique et Réparatrice de l'Adulte
VAGUE ..... Clinique d'Endocrinologie

Professeurs sans chaire

MM. BERNARD P.M.
CARCASSONNE Y.
CHEVROT
CODACCIONI
DALMAS
DUMON
GASCARD
MM. GEVAUDAN
GERINEL
Mme JOUVE
MM. LOUIS
MURATORE
NICOLI
PLASSE
MM. ROLLAND
SALAMON
SEITE
TATOSSIAN
VITRY
ZWIRN

Maître de conférences Agrégés

MM. ACHARD
ALDIGHIERI
ARGEME
BAILLE
BARDOT
BATTESTI
BAURAND
BERGOIN
BERNARD P.J.
BIMAR
BONNEAU
BOUTIN
BOUYALA
BOYER J.B.
BUISSON
BUREAU
CARTOUZOU
CHARREL
CLAUSTRE
CLEMENT J.P.
CLEMENT R.
COMBALBERT
COTTE
DELBOY
DERLON
DOR
DUFOUR
MM. FARISSE
FIGARELLA J.
FRANCOIS
FOURNIER
GABRIEL
GALINIER
GARCIN
GAUTHIER
GIRAUD F.
GRIMAUD
HUGUET
IMBERT Paul
JOUGLARD
KAPHAN
KHALIL
LEBREUIL
LOUCHET
LUCIANI J.M.
LUCCIONI R.
MALMEJAC Cl.
MERCIER Cl.
METGE
MICHEL-BECHET
MIRANDA
MONTIES
MURISASCO
OLMER
MM. OHRESSER
PADOVANI
PERRIMOND
PIANA
PICAUD
Mlle PINSARD
MM. POGGI
PRIVAT
QUILICI
RAYBAUD C.
REBOUD
RICHAUD
ROHNER J.
ROUX H.
RUF
SALDUCCI
SARACCO
SARLES J.
SEDAN
SERRATRICE
SOULAYROL
SPITALIER
Mlle STRIGLIONI
MM. TARANGER
TORRESANI
UNAL
VAGUE Ph.

Agrégés en exercice

MM. BRICOT

MONGES André

Agrégés libres

MM. BERARD
BERTHIER
BREMOND
BOURRET
CASANOVA
CHAUVIN

MM. COIGNET
COMITI
COURBIER
FIGARELLA
GAMBARELLI
GARES

MM. JEAN
MICHOTEY
OLLIVIER
OURGAUD
PAOLI

Cette thèse est dédiée

A MA FEMME

Depuis le début, nous avons poursuivi ces études ensemble, soutenus par une tendresse grandissante.

Tu as su me comprendre et m'aider pendant toutes ces années difficiles. Ton ardeur et ton enthousiasme restent pour moi un exemple.

Trouve ici le témoignage d'un immense Amour qui nous permettra de surmonter tous les obstacles.

A MES PARENTS

Vous m'avez permis de réaliser un très ancien rêve d'enfant.

Pour la merveilleuse ambiance dont vous avez toujours su m'entourer, pour l'aide et l'encouragement que vous m'avez donné tout au long de ces études, veuillez trouver dans cette thèse l'hommage de ma plus profonde reconnaissance et de ma très grande affection.

A MON FRERE ET A MA SOEUR

Qu'ils trouvent ici l'expression de mon très grand amour fraternel.

A MA FAMILLE, et en particulier à mon oncle, Monsieur Fernand RIPOLL, auquel la présentation matérielle de ce travail doit tant.

A MA BELLE FAMILLE

A TOUS LES MIENS

A mon Maître et Président de Thèse,

Monsieur le Professeur Jacques TAMALET

Au cours de deux séjours dans votre Service, puis à l'occasion du Certificat de Virologie, j'ai pu apprécier votre très grande maitrise de la Biologie et vos immenses qualités humaines.

Vous avez bien voulu accepter la Présidence de ce jury, et j'y vois, en plus d'un grand honneur, un nouveau témoignage de l'amical intérêt que vous avez toujours manifesté à mon égard. J'en suis très fier et je tiens à en rester digne.

Croyez que mes sentiments sont plus profonds que le respect que je vous dois ; permettez-moi de vous exprimer toute ma gratitude et de formuler l'espoir de me perfectionner encore à vos côtés.

A mes Maîtres et Juges,

A Monsieur le Professeur Pierre GEVAUDAN

Lors du Certificat puis du Diplôme de Microbiologie, j'ai beaucoup admiré vos très grandes connaissances dans l'immense domaine de la Virologie.

Vos travaux font de Vous un Juge particulièrement compétent.

Je suis heureux de pouvoir vous témoigner ici mon admiration et ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Raymond DEPIEDS

J'ai eu le privilège, pendant un an, d'apprendre auprès de vous l'Immunologie. Vous avez su nous faciliter la compréhension de cette Science difficile.

Pour l'acceuil que vous m'avez toujours réservé dans votre Service et pour la qualité de votre enseignement, je vous prie de trouver ici toute ma gratitude et le témoignage de mes sentiments respectueux.

A Monsieur le Professeur Agrégé Henri BONNEAU

Je vous dois une gratitude toute spéciale pour avoir bien voulu m'acceuillir au Service de Recherches du C.R.A.C.M. que vous dirigez d'une manière remarquable.

L'année que j'y ai passée a été une des plus enrichissantes de mes études.

Je vous prie de bien vouloir trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance et de mes sentiments hautement respectueux.

A Monsieur le Professeur Jacques C. SENEZ

Croyez, Monsieur, que je sais l'immense honneur que vous me faites en acceptant de siéger dans ce jury.

J'ai ainsi l'occasion de vous exprimer la très vive admiration que je ressens pour vous même et pour l'Ecole que vous dirigez.

J'espère que ce travail sera digne d'être jugé par vous.

Veuillez trouver ici le témoignage de mon très profond respect.

A Monsieur le Docteur Georges MEYER

Vous m'avez inspiré ce travail passionnant dont le sujet est l'une des nombreuses préoccupations de votre esprit toujours en alerte. Vous l'avez ensuite suivi et dirigé de bout en bout.

Au cours de l'année passée à votre contact, dans un climat remarquable, j'ai tenté d'assimiler votre goût de la rigueur et votre constant souci d'aller au fond des choses. J'ai, en tout cas, beaucoup appris.

Permettez-moi de vous exprimer ma profonde gratitude et de vous assurer de mon respectueux attachement et de mon total dévouement.

A Monsieur le Professeur Xavier SERAFINO, Directeur du C.R.A.C.M.

Pour avoir bien voulu m'acceuillir au Centre Anti-Cancéreux de Marseille.

Avec toute ma reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Robert de VERNEJOUL, Membre de l'Institut.

Avec une grande reconnaissance pour l'intérêt que vous avez manifesté à l'égard de nos travaux.

En témoignage de mon très haut respect.

A Monsieur le Professeur Jean BRAHIC, dans le Laboratoire duquel j'ai actuellement l'honneur et le plaisir d'être Assistant, après y avoir passé deux années comme Moniteur.

A mes Maîtres, Professeurs, et Maîtres de Conférences de la Faculté des Sciences de Marseille :

Messieurs : *BELLAICH*
DELAAGE
DESNUELLE
DEVEZE
FOUGEREAU
NAUDET
ROSSET
SEMERIVA
SENEZ

A mes Maîtres de la Faculté de Médecine chez lesquels j'ai commencé à apprendre la Biologie Humaine.

A Mademoiselle Lydia PONS

Sa très haute technicité et son dévouement m'ont permis de toujours disposer du matériel biologique nécessaire.

Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

A Yves BARRA et Marie Edith LAVY

Nos discussions sur la Concanavaline A, même orageuses, ont été fructueuses.

Trouvez ici l'expression de ma chaleureuse amitié.

A Françoise BIRG

Je te dois les résultats d'historadiographie et de nombreuses critiques stimulantes.

A Monique BEREBBI

Notre collaboration a été fructueuse et agréable. Je t'en remercie.

A mes amis et collègues du Service de Recherche du C.R.A.C.M.

Monsieur le Docteur Jean-Pierre CESARINI
Madame Catherine DE MICCO-PAGIS
Monsieur le Docteur Roger FAVRE
Monsieur le Docteur Jean-Pierre KLEISBAUER, Assistant de Biochimie
Madame Marie-Anne NOSNY-CHRESTIAN
Monsieur Roland POIRIER
Madame Christiane VERRIER

A tout le personnel technique du Service de Recherche du C.R.A.C.M.

Au Service d'Iconographie du C.R.A.C.M.

A mes amis du Service de Bactériologie et de Sérologie de l'Hôpital de la Conception (Professeur J. BRAHIC), auxquels ma formation microbiologique doit tant.

A mes amis du Service de Microbiologie de la Faculté Nord (Professeur J. TAMALET).

A Mademoiselle Francine SIMULA, qui avec une inépuisable gentillesse et une constante bonne volonté a déchiffré et mis au propre le manuscrit.

Qu'elle trouve ici mes sincères remerciements.

Au Comité Départemental de la Ligue Nationale Française contre le Cancer des Hautes Alpes.

Ce travail a été rendu possible grâce à la Bourse que vous avez vien voulu m'accorder

J'espère en avoir été digne.

Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude.

A Monsieur OLIVA, Président du Groupement des Entreprises Françaises dans la Lutte contre le Cancer.

Ce travail fait partie d'un programme sur contrat de l'INSERM accordé à G. MEYER (Contrat nº 714 017).

"Ainsi, l'étude des virus a cessé d'être pour nous simplement un épisode de la lutte contre les maladies infectieuses, si importantes fussent-elles. Elle est devenue une voie d'abord et d'exploration de la physiologie cellulaire, un champ des plus passionnants parmi les recherches de Biologie, et peut être le moyen par lequel nous arriverons à la solution du problème du Cancer".

Pierre LEPINE 1961

SOMMAIRE

INTRODUCTION

LEXIQUE

LA CONCANAVALINE A

LA LIGNEE CELLULAIRE BHK 21

LE VIRUS POLYOME

LES METHODES DE QUANTIFICATION DE L'ACTION DE LA CONCANAVALINE A

ETUDE DE L'AGGLUTINABILITE CELLULAIRE AU COURS DU CYCLE DU VIRUS POLYOME

DISCUSSION

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

L'importance des phénomènes de surface en Biologie cellulaire se révèle de jour en jour plus considérable.

Si ces phénomènes jouent un rôle de premier plan dans des processus aussi divers que le développement et l'organisation embryonnaire, la différenciation cellulaire, la régulation de l'activité mitotique et l'inhibition de contact, les relations intercellulaires, enfin la sensibilité à un certain nombre de drogues et d'hormones, ce rôle devient fondamental dans les mécanismes d'invasion tumorale et de développement de métastases. C'est cependant dans le phénomène de transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse que les propriétés de surface interviennent le plus. Certains auteurs (SACHS 1965 *(218)* , HAKOMORI et coll. 1968, INBAR et SACHS 1969 *(138)* , BURGER 1969 *(39)* , SELA et coll. 1970 *(224)*) ont même avancé que ces modifications de surface ne se contentaient pas d'accompagner la transformation en tant que simple conséquence, mais que les changements dans le système de régulation cellulaire produits par la transformation maligne pouvaient être directement attribués aux modifications de la surface cellulaire.

Ces modifications de surface sont de nature diverse : morphologiques, tel l'épaississement de la membrane de certaines cellules cancéreuses, immunologiques, telle l'apparition de néo-antigènes de surface, biochimiques, telle la modification des sites superficiels de fixation et de pénétration de certaines molécules. Leur étude analytique directe se heurte cependant à de nombreuses difficultés.

L'utilisation de méthodes d'étude indirectes s'est rapidement révélée indispensable. Parmi celles-ci, l'emploi de substances végétales à activité agglutinante, découvertes par DIXSON en 1887 et dénommées "lectines" par BOYD en 1953 *(38)* , constitue une méthode d'investigation tout à fait priviligiée, et très largement exploitée.

Ces lectines sont des substances généralement protéiques, glycoprotéiques ou mucoprotéiques, tirées de la racine ou des graines d'un grand nombre de légumineuses (haricots de diverses espèces, pois, fèves). Elles sont depuis longtemps utilisées en immuno-hématologie pour la détection de certains antigènes portés par les hématies, et elles ont la particularité de présenter des interactions très spécifiques avec certaines cellules cancéreuses, se traduisant essentiellement par une agglutination.

La plus connue de ces substances est certainement la Phytohémagglutinine, tirée de la graine de Phaseolus vulgaris, et très utilisée en Immunologie pour ses propriétés mitogènes. Leur nombre ne cesse de s'accroître et on peut citer, parmi les plus importantes : l'agglutinine du germe de blé, celle du soja, et celle du haricot JACQUIER, la Concanavaline A. La découverte de cette dernière remonte à 1916 et un très grand nombre de travaux lui ont été consacrés tant du point de vue de sa structure que de ses propriétés.

Dans ce travail, nous nous sommes spécialement attachés à l'étude d'un modèle de transformation particulier : la transformation abortive de la cellule de hamster par le virus polyome, au moyen d'une lectine particulière, la Concanavaline A.

Dans ce but, nous nous proposons de suivre le plan suivant :

– Description du matériel utilisé et de ses propriétés principales :
La Concanavaline A, la Cellule BHK 21 et le virus Polyome.

– Etude des différentes méthodes d'utilisation de la Concanavaline A et description d'une méthode originale d'évaluation de l'agglutination.

– Résultats obtenus lors de l'étude de cellules transformées par le virus polyome et des modifications de surface survenant chez la cellule BHK 21 infectée par le virus polyome (cycle abortif).

– Discussion

LEXIQUE

Nous avons utilisé les abréviations suivantes :

ADN : Acide Désoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
Å : Angstrom
nm : nanomètre
mμ : Millimicron
μ : Micron
1 nm = 1 mμ = 10 Å
μg : microgramme
ml : millilitre
DT 50 : Dose tumorale 50 %
S : Svedberg (unité de sédimentation).
Kcal : Kilo-calorie.

Par ailleurs, il nous parait utile de rappeler les définitions exactes d'un certain nombre de termes, très fréquemment utilisés. Nous empruntons ces définitions à une mise au point terminologique faite par M. BEREBBI et G. MEYER en 1968 *(28 bis)* à partir des propositions de la "TISSUE CULTURE ASSOCIATION" réunie en 1961.

CULTURE DE TISSU

La culture des tissus animaux comprend l'étude des cellules, des tissus et des organes d'origine animale maintenus en survie ou se développant in vitro pendant plus de 24 heures.

MONOCOUCHE

Ce terme se rapporte à des cellules poussant sur une surface en couche unique.

PRIMOCULTURE

Désigne une culture à partir de cellules, de tissus ou d'organes directement prélevés sur l'organisme donneur. Une "primoculture" peut être considérée comme telle jusqu'à ce qu'elle soit mise en "subculture" pour la première fois. Elle devient alors une lignée cellulaire.

LIGNEE CELLULAIRE

Une lignée cellulaire se forme à partir d'une primoculture au moment de la première subculture.

Le terme de lignée cellulaire implique que les cultures qui en proviennent se

composent de nombreuses familles cellulaires déjà présentes dans la primoculture. En fait, on admet beaucoup plus généralement que la lignée cellulaire correspond à un seul type de cellule et qu'une culture ne mérite cette appellation que lorsqu'elle a prouvé son aptitude à un certain nombre de subcultures.

LIGNEE CELLULAIRE CONTINUE

Une lignée cellulaire est devenue "continue" quand elle a prouvé son pouvoir de se perpétuer indéfiniment in vitro par subculture.

Il semble qu'une culture doive subir au moins 70 subcultures (à 3 jours d'intervalle entre les subcultures) avant de pouvoir être considérée comme continue.

SOUCHE CELLULAIRE

Une souche cellulaire est un ensemble de cellules ayant des caractéristiques spécifiques (caractères "marqueurs") dérivant soit d'une primoculture soit d'une lignée cellulaire par sélection ou par clonage. Ces caractères spécifiques doivent persister au cours des cultures suivantes.

CLONE

Population de cellules dérivées d'une cellule unique par mitoses successives. Un clone n'est pas nécessairement homogène.

SUBCULTURE (OU "PASSAGE")

Passage des cellules d'un récipient dans un autre. (Après décollement par trypsination ou EDTA et changement de milieu le plus souvent).

Le nombre de subcultures est le nombre de fois où les cellules ont été subcultivées, c'est à dire transplantées d'un flacon dans un autre.

TEMPS DE GENERATION CELLULAIRE

Ce terme définit l'intervalle de temps entre deux divisions consécutives d'une cellule.

RENDEMENT ABSOLU EN COLONIES

Pourcentage de cellules isolées qui donnent naissance à des colonies quand elles sont ensemencées dans des récipients de culture.

POUVOIR ONCOGENE (OU "TUMORIGENICITE")

Capacité de provoquer des tumeurs chez l'animal. Le pouvoir oncogène ne peut être déterminé que par observation du comportement des cellules chez l'animal.

Il peut être quantifié par la détermination de la DT 50 ou du temps d'apparition des tumeurs.

LA CONCANAVALINE A

A – DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

B – EXPERIENCES PRELIMINAIRES

A – DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

DECOUVERTE

PREPARATION - PURIFICATION

STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

1) - Nature
2) - Poids moléculaire
3) - Structure moléculaire
4) - Interactions avec les métaux
5) - Interactions avec les sucres
6) - Dénaturation
7) - Marquage

PROPRIETES

1) - Propriétés générales
   a) Propriétés hémagglutinantes
   b) Actions sur divers systèmes biologiques
2) - Toxicité
3) - Propriétés immunologiques
   a) Généralités
   b) Pouvoir immunogène
   c) Action sur l'immunité à médiation cellulaire.
4) - Action sur la phagocytose et la division cellulaire
5) - Action sur les tumeurs constituées
6) - Action agglutinante sur les cellules transformées
7) - Autres propriétés
   a) Action sur les caractères de culture
   b) Action sur la mobilité des cellules tumorales.

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

A - DECOUVERTE

En 1911, ASSMAN découvre que l'extrait brut de haricot Jacquier (Canavalia ensiformis) contient une substance capable d'agglutiner les globules rouges de certaines espèces animales (hémagglutinine).

En 1916, JONES et JOHNS *(141)* , à partir de l'extrait de ce même haricot, isolent deux globulines distinctes. Ils les nomment CANAVALINE et CONCANAVALINE.

SUMNER (1919 *(247)*) montre que la Concanavaline isolée par les deux auteurs précédents est en fait elle-même constituée de deux protéines différentes : la Concanavaline A et la Concanavaline B, toutes deux cristalisables.

Enfin, en 1936, SUMNER et HOWELL *(249)* démontrent que l'hémagglutinine du haricot Jacquier décrite par ASSMAN est en fait la Concanavaline A de SUMNER. Il s'agit là de la première phytohémagglutinine isolée sous forme cristallisée.

B - PREPARATION ET PURIFICATION

SUMNER a montré dès 1919 *(247)* que la méthode de fractionnement par le sulfate d'ammonium ne pouvait pas être utilisée seule pour la préparation et la purification de la Concanavaline A.

La méthode de préparation la plus utilisée encore actuellement est la méthode décrite par JONES et JOHNS (1919 *(141)*) et SUMNER et HOWELL (1936 *(249)*).

Elle consiste à traiter 100 grammes de farine de haricot Jacquier finement pulvérisée par 500 ml d'acétone à froid pendant 4 à 5 heures puis par 500 ml d'éthanol à 30°/o et à filtrer. Le filtrat est éliminé et l'extraction de la protéine effectuée sur le residu avec 400 ml de solution de NaCl à 1 °/o , puis 400 ml de solution de NaCl à 5 °/o . Le résidu est éliminé ; les deux filtrats sont réunis et dialysés, en présence de quelques gouttes de toluène, contre de l'eau distillée pendant 24 heures. Les cristaux de Concanavaline sont récupérés par centrifugation, lavés une fois avec une solution de NaCl à 10 °/o et dissous dans une petite quantité de solution HCL 0,1 N, qui est elle-même exactement neutralisée au bout d'une demi-heure par quelques gouttes de Na OH 0,1 N. La solution est alors dialysée pendant plusieurs heures contre de l'eau distillée et les cristaux de Concanavaline A récupérés par centrifugation. Ils sont enfin dissous dans une solution sursaturée de NaCl à la température de 40° C.

Cette méthode permet d'obtenir 2 à 2,5 grammes de Concanavaline A à partir de 100 grammes de farine. La quantité obtenue varie avec les différentes variétés de haricot Jacquier utilisées. Le produit préparé par cette méthode n'est jamais complètement exempt de glucides : il contient environ 4 °/o de sucres que l'ont peut extraire par un traitement à l'acide acétique à concentration molaire.

AGRAWAL et GOLDSTEIN (1965*(4)* et 1967 *(5)*) se fondant sur la spécificité de la fixation de la Concanavaline A sur les résidus de glucose, ont mis au point une méthode de préparation et de purification plus simple.

Deux cent grammes de farine sont traités à froid pendant 12 heures avec 2 litres de solution de NaCl 0,15 M. La fraction insoluble est rejetée et la fraction soluble contenant les protéines est précipitée par des concentrations progressives de sulfate d'ammonium allant de 30 °/o à 80 °/o de saturation. Ces fractions réunies contiennent toute la Concanavaline A. La préparation est ensuite passée sur une colonne à chromatographie de 4 cm x 50 cm contenant du SEPHADEX G-50 et équilibrée par une solution de NaCl I,OM. Les différentes fractions sont récupérées dans l'ordre d'apparition dans un collecteur. La teneur en protéines de chaque fraction est déterminée par mesure de la densité optique à 280 nm et l'activité biologique est testée par la capacité d'agglutiner les hématies de mouton lavées. Toutes les protéines inactives sortent alors dans un premier pic tandis que la Concanavaline A reste fixée aux résidus glucose du SEPHADEX. Elle est secondairement déplacée par une solution de D-glucose O,IM dans du NaCl O,1M selon la méthode primitivement décrite par KABAT pour les immuno-adsorbants. Le glucose qui a servi à éluer la protéine est enfin éliminé par dialyse du complexe contre une solution de NaCl O,1M.

La Concanavaline A préparée de cette façon est pure à 98 °/o et présente un très haut degré d'activité agglutinante vis-à-vis des hématies de mouton.

Pour notre expérimentation, nous avons utilisé la Concanavaline A deux fois cristallisée en solution à 4°/o dans une solution sursaturée de NaCl (Laboratoires MILES, Elkart, Indiana USA). Cette substance est homogène à l'ultra-centrifugation et à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (pic et bande uniques). Elle est parfaitement exempte de glucides. Elle est conservée à la température ambiante où elle est parfaitement stable et ne subit pas de dénaturation notable tout en conservant ses propriétés agglutinantes pendant plusieurs semaines.

Elle peut cependant être souillée par le développement de germes bactériens, mais cet inconvénient peut être évité par une réduction du nombre de manipulations qui doivent s'effectuer avec précautions.

C - STRUCTURE - PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES

1) - NATURE

Le spectre d'absorption de la Concanavaline A est caractéristique des protéines ; elle a un maximum de densité optique à 278 nm et un minimum à 250 nm. Son coefficient d'extinction à 280 nm en solution de NaCl molaire est E 1°/o /1 cm= 11,4. Le rapport tyrosine / tryptophane est de l'ordre de 1,78.

Le point isoélectrique pHi, déterminé par électrophorèse en veine libre selon TISELIUS est de 7,1. Au pH de 7,4 où elle est le plus souvent employée, la Concanavaline A porte une charge nette négative et se comporte donc comme une molécule anionique (AGRAWAL et GOLDSTEIN 1967 *(6)*).

Le coefficient de sédimentation varie avec le pH auquel la molécule est placée. A pH 5,0 , $S_{20,w}$ = 4 S tandis qu'à pH 7,0 il est de 6 S.
(OLSON et LIENER 1967 *(191)*).

La composition en acides aminés a pu être déterminée par AGRAWAL et GOLDSTEIN (1968 *(7)*). La protéine contient 15,2 °/o d'azote. On y retrouve tous les acides aminés usuels (et en particulier une grande quantité de résidus d'acide aspartique et de sérine) à l'exception de la cystéine. Cette absence de résidus de cystéine permet d'exclure de la structure de la molécule la présence de ponts disulfure intra ou extra-caténaires.

Le résidu N-terminal, déterminé par la méthode de SANGER au dinitrofluorobenzène est l'alanine, Il y a 1 à 1,5 résidu N-terminal par molécule, ce qui est un argument en faveur du fait que la sous-unité n'est constituée que d'une seule chaine polypeptidique. Cette donnée est confirmée par BECKER et coll. (1971 *(22)*).

2) - POIDS MOLECULAIRE

La connaissance précise du poids moléculaire de la Concanavaline A présente un grand intérêt, en particulier pour la détermination de la densité des sites cellulaires de surface fixant cette molécule. Il a donné lieu à de nombreuses controverses qui ne sont pas encore complètement apaisées.

En 1938, SUMNER et coll. *(248)* donnent un poids moléculaire de 9,6 x 10^4 daltons. AGRAWAL (1938 *(3)*) ramène ce chiffre à 6,8 x 10^4 en utilisant des techniques de détermination par la mesure des coefficients de sédimentation et de diffusion. En fait, KALB et LUSTIG ont montré en 1968 *(145)* que le poids moléculaire déterminé par la

méthode d'équilibre de sédimentation sur une protéine cristallisée obtenue selon la méthode de SUMNER et HOWELL, varie dans des limites très larges en fonction du pH. Les valeurs trouvées, confirmées par OLSON et LIENER (1967 *(191)*) en utilisant une méthode de filtration sur colonne de BIOGEL-P 100, et qui sont actuellement le plus généralement admises, sont réunies dans le tableau n° 1.

Au pH d'utilisation courant (pH 7,4), la molécule a donc un poids moléculaire de l'ordre de 7×10^4 à 10^5 daltons.

3) - STRUCTURE MOLECULAIRE

Ces résultats suggèrent que la molécule de Concanavaline A est en fait constituée d'un certain nombre de sous-unités et que les structures décrites résultent de la polymérisation de plusieurs monomères.

L'accord n'est pas parfait sur la taille du monomère. Pour OLSON et LIENER (1967 *(192)*) la sous-unité a un poids moléculaire de 17500. WANG et coll. (1971 *(263)*) isolent un dimère de 54000 daltons. Pour HARDMAN et coll. (1971 *(121)*), toutes les sous-unités sont identiques, ont un poids moléculaire moyen de 27000 et la molécule entière est un tétramère de poids moléculaire 108000. Ces données sont confirmées par BECKER et coll. (1971 *(22)*) qui, par étude de l'équilibre de sédimentation, trouvent quatre monomères de 27000 daltons arrangés dans l'espace selon une symétrie de type D2 pour former une structure tétraédrique.

La Concanavaline A cristallise dans le système orthorhombique (1,2,2,2) avec les paramètres cristallographiques suivants :

$a = 89{,}9$ Å $\quad b = 87{,}2$ Å $\quad c = 63{,}1$ Å (GREER et Coll. 1970 *(112)*).

HARDMAN et coll. (1971 *(121)*) et QUIOCHO et coll. (1971 *(210)*) ont étudié la structure de la molécule par la méthode de diffraction des rayons X à 4,25 puis à 4 Å de résolution. Les dimensions de la sous-unité sont de l'ordre de 46 x 26 x 42 Å. Ces sous-unités sont assemblées en dimères allongés qui se groupent en tétramères en formant entre eux un angle droit. Chaque dimère possèderait deux sites de fixation pour les cations métalliques bivalents et un site de fixation pour les sucres, représenté par une dépression à la surface de la molécule.

Les sites de fixation des sucres sont séparés par 24,6 Å sur le même dimère et par 35,1 Å sur les dimères différents.

Par étude de la dispersion du pouvoir rotatoire de la lumière et par des techniques de spectroscopie dans l'ultra-violet, ZAND et coll. (1971 *(279)*) ont démontré que, entre pH 2,0 et pH 5,0, on ne pouvait mettre en évidence qu'un seul composant de 3,9 S. Entre

TABLEAU N° 1

pH	Tampon	PM
2,2	Acétate	$4,0 \times 10^4$
3,5 à 5,8	Acétate 0,02M	$5,4$ à $5,5 \times 10^4$
7,0	Phosphate 0,01M	$7,1 \times 10^4$
7,3	Acétate	$8,8 \times 10^4$
7,4	"	$10,0 \times 10^4$
7,8	"	$10,7 \times 10^4$
10,2	"	$10,8 \times 10^4$

POIDS MOLECULAIRE DE LA CONCANAVALINE A EN FONCTION DU pH (selon OLSON et LIENER - 1967)

PH 5,0 et pH 7,0, la majorité de la molécule est sous forme de dimères et possède une configuration de type β. A pH supérieur à 7,0, la molécule est sous forme de tétramères de 6S et les sous-unités sont presqu'entièrement sous forme de pelote statistique. La structure en α - hélice de PAULING et COREY n'a jamais pu être mise en évidence (HASSING et GOLDSTEIN 1970 *(125)*).

4) - INTERACTION AVEC LES METAUX

En 1936, SUMNER et HOWELL *(249)* démontrent que des traces de cations bivalents tels que Ca^{++}, Mg^{++} et Mn^{++}, normalement présents dans la molécule native, sont indispensables à l'activité de la Concanavaline A.

Les cations bivalents (Mg^{++}, Mn^{++}, Ca^{++}, Co^{++}, Ni^{++} et Zn^{++}), en effet, restaurent l'activité de la Concanavaline A inactivée par dialyse contre une solution d'acide acétique molaire (AGRAWAL et GOLSDSTEIN 1968 *(7)*).

NICOLAU et coll. (1969 *(185)*) et COHN (1970) ont mis en évidence, par des études de résonance paramagnétique électronique, la présence de sites de fixation du manganèse et du nickel sur la molécule. La présence de manganèse dans la proportion de 0,029% a été confirmée par analyse par activation neutronique.

La Concanavaline A fixe les cations métalliques bivalents sur deux types de sites différents. Une première sorte de sites, Sl, est capable de fixer les métaux de transition à l'exception du calcium et du magnésium. Chaque molécule possède deux sites Sl, situés sur chacun des dimères. Une seconde catégorie de sites, S2, hautement spécifique, ne fixe des ions Ca^{++} que si les sites S1 sont occupés par un ion Ni^{++} ou Mn^{++}. Il y a également deux sites S2 par molécule de Concanavaline A. Les sites de fixation des sucres ne deviennent fonctionnels qu'à la condition que S1 soit occupé par un métal de transition et S2 par un ion Ca^{++}. Ce caractère séquentiel de la fixation et de l'activation paraît tout à fait fondamental (KALB et LEVITZKI 1968 *(144)*).

5) - INTERACTION AVEC LES SUCRES

Dès 1936, SUMNER et HOWELL *(249)* démontrent que la Concanavaline A agglutine les grains d'amidon provenant de certains féculents (maïs, riz et blé) mais pas d'autres (pomme de terre). Elle donne aussi quand on la met en présence de solutions de glycogène des précipités insolubles. Ils notent, dès cette époque, l'analogie de cette interaction avec une réaction antigène-anticorps.

Des expériences ultérieures ont montré que la Concanavaline A réagit avec de très nombreuses substances de nature polysaccharidique ou glycoprotéique, tant naturelles (glucosanes type amidon et glycogène ; mannanes ; et autres polyosides bactériens, végétaux et animaux) qu'artificielles (dextran, type Sephadex, Sépharose) (GOLDSTEIN et coll. 1967 *(103)*). L'action sur les polyosides bactériens a spécialement été étudiée par REEDER et EKSTEDT (1971 *(214)*) chez le Staphylocoque, par DOYLE et BRISDELL (1972 *(70)*), chez Bacillus subtilis et par ARCHIBALD et COAPES (1971 *(10)*).

Une somme considérable de travaux a été consacrée à ce sujet et des précisions essentielles ont été apportées, en prenant comme modèle la réaction antigène-anticorps.

CIFONELLI et coll. (1956 *(47)*) ont rendu cette étude quantitative en remarquant que la turbidité (donc la quantité de complexes formés) mesurée en présence d'une quantité fixe de Concanavaline A variait de façon linéaire avec la concentration en glycogène.

GOLDSTEIN et coll. (1965 *(100, 101)*), SO et GOLDSTEIN (1967 et 1968 *(230, 232)*), YARIV et coll. (1968 *(277)*), ont adapté la méthode d'inhibition hapténique de la réaction de précipitation décrite par LANDSTEINER aux problèmes posés par la Concanavaline A. Cette méthode présente un grand intérêt en Immunologie pour la détermination de la structure moléculaire d'un site antigénique. Nous rappelons qu'elle consiste à mesurer la diminution de poids du précipité formé par le complexe antigène-anticorps quand on traite l'anticorps par une molécule, dite inhibitrice, dont la configuration moléculaire se rapproche de celle de l'antigène étudié. Il s'agit, en effet, le plus souvent d'une petite molécule de poids moléculaire faible, qui se fixe sur l'anticorps sans former de précipité mais qui empêche sa fixation ultérieure sur l'antigène. Le degré d'inhibition est proportionnel à la parenté chimique entre le composé inhibiteur et l'antigène étudié : l'inhibition est maximum quand la substance inhibitrice est constituée par l'antigène lui-même, elle est nulle quand la molécule utilisée et l'antigène n'ont entre eux aucune parenté.

Cette méthode a été appliquée à l'étude de la réaction de la Concanavaline A avec un de ses réactifs privilégiés, le glycogène, et en utilisant comme substance inhibitrice un très grand nombre de molécules glucidiques simples et complexes, naturelles et artificielles (GOLDSTEIN et coll. 1965 *(101)*).

Les résultats ont été les suivants :

– L'activité inhibitrice est d'autant plus grande que l'indice de branchement est plus élevé sur la molécule testée, et il existe une relation linéaire entre l'indice de branchement et le poids du précipité formé (MANNERS et WRIGHT 1962 *(164)*). Les polysaccharides linéaires non ramifiés ne forment pas de précipité avec la Concanavaline A et ne sont pas inhibiteurs quel que soit leur poids moléculaire. Par contre, le pourcentage

d'inhibition ne semble pas dépendre du type de branchement, et le glycogène portant des liaisons α 1-6 est aussi inhibiteur que les dextrans porteurs de liaisons en α 1-2, α 1-3 ou α 1-4.

– Parmi les monosaccharides, les aldohexoses sont plus inhibiteurs que les pentoses. Le D-mannose est environ cinq fois plus inhibiteur que le D-glucose. Le Fructose et le Sorbose sont plus faiblement inhibiteurs. Certains pentoses (D-arabinose) sont également inhibiteurs mais à un moindre degré.

– Les disaccharides sont environ dix fois plus inhibiteurs que les monosaccharides, à la condition de possèder une liaison α - glucosidique comme le maltose. Les disaccharides à configuration β (cellobiose, gentibiose) sont de très mauvais inhibiteurs.

– Les groupements hydroxyle en position 3, 4 et 6 doivent être libres pour que la molécule conserve son activité inhibitrice. Ainsi, l'halogénation par le chlore, l'iode ou le fluor et la réduction ou l'alkylation en position 3 ou 6 diminuent fortement l'activité inhibitrice. Il existe de plus une certaine stéréospécificité de la reconnaissance puisque le D-allose et le D-galactose, épimères du glucose en 3 et 4 ne sont pas inhibiteurs. Le groupement hydroxyle en position 2, par contre, n'est pas essentiel à la fixation sur la protéine (le 2-déoxy-D-glucose et le 2-0-méthyl-D-glucose sont de bons inhibiteurs).

– La présence d'un groupement alkyl en position 1, et en particulier d'un groupement méthyl, augmente beaucoup l'activité inhibitrice et c'est ainsi que l'α-méthyl-D-mannose et l'α-méthyl-D-glucose sont les deux molécules les plus inhibitrices. Le β-méthyl-D-glucose n'est pas inhibiteur.

– L'inhibition nécessite une structure cyclique de type pyranose, puisque les molécules linéaires ne sont pas inhibitrices.

– Enfin, il a été montré que, sur une chaine polysaccharidique, le fragment qui réagit avec la Concanavaline A est la partie située à l'extrémité terminale non réductrice.

Ainsi, on peut supposer que le site réagissant spécifiquement avec la Concanavaline A est une structure osidique pyranosique, possèdant des groupements hydroxyle libres en position 3, 4 et 6, substituée en position 1 par un radical alkyl de poids moléculaire très faible, auquel elle est reliée par une liaison de configuration α, et située à l'extrémité non réductrice de la chaine latérale d'une molécule polysaccharidique.

Toutes ces données ont été confirmées par l'utilisation de polymères synthétiques ou semi-synthétiques de structure connue (GOLDSTEIN et IYER 1966 *(102)*). Cependant, il faut noter que PLOW et RESNICK (1970*(206)*), en utilisant des molécules hydroxylées de longueur connue à trois atomes de carbone (glycérol) ou à quatres carbones (butanol) obtiennent un certain pourcentage d'inhibition et ce pourcentage d'inhibition est directement proportionnel à l'importance de la condensation en carbone et au

nombre de groupements hydroxyle présents sur la molécule. La spécificité de ce genre de liaison parait donc moins étroite que pour la réaction antigène-anticorps.

PORETZ et GOLDSTEIN (1970 *(209)*) ont calculé que la fixation de l'α -méthyl-D-glucopyranose sur la protéine au niveau du site récepteur spécifique s'accompagne d'une variation d'énergie libre de l'ordre de - 5,4 à -9,9 Kcal par mole, ce qui correspond à une constante d'association K de $2,06 \times 10^4 M^{-1}$. La valeur très élevée de cette variation d'énergie libre, qui fait de cette interaction une réaction hautement exergonique, s'expliquerait par le fait que la fixation du sucre entraine une modification de structure de la protéine qui prendrait ainsi une configuration plus "probable" et donc thermodynamiquement plus stable (PFLUMM et coll. 1971 *(205)*). La valeur élevée de la constante d'association explique la grande affinité de la Concanavaline A pour les sucres et les difficultés que l'on a pour l'obtenir et la maintenir à l'état pur.

La liaison entre la Concanavaline A et les sucres est de nature non covalente. Pour DOYLE et coll. (1968 *(71)*), la liaison entre la protéine et les polysaccharides neutres est du type liaison hydrogène et peut-être liaison hydrophobe, mais la Concanavaline A peut contracter des liaisons électrostatiques avec des molécules chargées, porteuses de groupements phosphate et sulfate. HASSING et coll. (1971 *(126)*) ont montré que les groupements carboxyle de la protéine intervenaient dans la liaison.

La question se pose actuellement de savoir si la Concanavaline A est une holoprotéine vraie, ou si l'existence sur la structure protéique de glucides liés par liaison covalente n'en fait pas une glycoprotéine.

Enfin, SO et GOLDSTEIN (1967 *(231)*) ont étudié les paramètres intervenant dans la réaction entre la Concanavaline A et les polysaccharides branchés par une méthode de précipitation quantitative utilisant le dextran comme réactif. Ils ont ainsi démontré que, d'une façon très analogue à la réaction antigène-anticorps :

– Le pH optimum de la réaction se situe entre 6,1 et 7,2.

– La température joue un grand rôle : la quantité d'azote protéique précipitée à 25°C est très supérieure à celle précipitée à 0°C. A 25°C, la réaction est complète en quelques heures.

– La force ionique, et en particulier la concentration en NaCl intervient peu si le pH est tamponné de façon satisfaisante autour de 7,0. Une certaine quantité de cations est cependant nécessaire, tant pour l'activation de la Concanavaline A que pour le déroulement de la réaction elle-même. L'iodure de potassium et le thio-cyanate de potassium sont inhibiteurs de la réaction.

– La présence de protéines étrangères et de substances de haut poids moléculaire intervient peu. La présence de méthanol, qui modifie la constante diélectrique de l'eau, augmente l'intensité de la réaction (PLOW et RESNICK 1970 *(206)*).

6) - DENATURATION

La Concanavaline A est inactivée par HCl 0,1N et par NaOH 0,1N d'une manière d'abord réversible puis irréversible (SUMNER et HOWELL 1936 *(249)*).

L'expérience nous a montré que, comme toutes les protéines, elle subit également une dénaturation irréversible quand elle est placée en solution très diluée et de force ionique faible. Cela exclut toute possibilité de conservation des solutions diluées, et prêtes à l'emploi, même à basse température, et exige une préparation extemporanée de la solution à tester.

La digestion par la pepsine, la chymotrypsine et la papaïne entraine la perte du pouvoir hémagglutinant. La trypsine a une action réduite, même quand elle est employée pendant un temps très long. Les nucléases et la neuraminidase sont inactives.

7) - MARQUAGE

L'utilisation de molécules de Concanavaline A marquées est actuellement indispensable, pour l'étude de plusieurs de ses propriétés. Les procédés de marquage sont nombreux et variés et sont destinés à mettre en évidence des propriétés différentes.

Les laboratoires MILES produisent une Concanavaline A contenant au moins 1,5 atome-gramme de manganèse, de cobalt ou de zinc par molécule-gramme de protéine. Ces substances titrées sont précieuses pour l'étude des interactions avec les métaux.

AGRAWAL et coll. (1968 *(8)*) ont montré que l'acétylation de la molécule au niveau de groupements amine ou phénol par de l'anhydride acétique marqué par le tritium ne compromettait ni la spécificité ni l'activité de la Concanavaline A.

Il s'agit d'un mode de marquage radioactif très largement utilisé.

ARNDT - JOVIN et BERG (1971 *(11)*) utilisent une protéine marquée à l'iode 125 sur des résidus tyrosine.

CLINE et LIVINGSTON (1971 *(49)*) emploient la Concanavaline A marquée par du Nickel 63 radioactif selon la méthode décrite par KALB et LEVITZKI (1968 *(144)*). INBAR et SACHS (1969 *(138)*) utilisent de la Concanavaline A dont le nickel a été activé par bombardement particulaire dans un accélérateur . La substance ainsi marquée émet d'ailleurs des rayonnements de type α la rendant dangereuse à utiliser.

LLOYD (1970 *(156)*) a préparé deux formes insolubles de la Concanavaline A qui furent utilisées pour séparer une grande variété de glucides et de glycoprotéines.

En vue de sa localisation en microscopie électronique, la Concanavaline A a été marquée par de nombreuses substances opaques aux électrons. NICOLSON (1971 *(186)*) et NICOLSON et SINGER (1971 *(187)*) couplent la Concanavaline A à la ferritine en utilisant la méthode à la glutaraldéhyde décrite par AVRAMEAS (1969 et 1970 *(14 , 15)* . BERNHARD et AVRAMEAS (1971 *(31)*) emploient une technique de révélation par la peroxydase : cette enzyme se fixe spontanément sur la protéine sans en masquer les sites réactifs et sa présence est ensuite révélée par la réaction à la 3,3'-diamino-benzidine en présence d'eau oxygénée. HORISBERGER et coll. (1971 *(131)*) visualisent la protéine par fixation d'atomes de mercure apportés par de l'acide para-chloro-mercuri-benzoïque sur des groupements thiols artificiellement créés.

Dans tous les cas, la Concanavaline A qui est naturellement transparente aux électrons devient visible sous forme de grains dont la taille et la densité dépendent du procédé de marquage.

D - PROPRIETES

I PROPRIETES GENERALES

1 - PROPRIETES HEMAGGLUTINANTES

La propriété principale de la Concanavaline A, qui a permis sa découverte, est son activité hémagglutinante.

Elle est en effet capable d'agglutiner les hématies lavées de nombreuses espèces animales mais pas de toutes. Cette action est sensible même à des concentrations très basses, de l'ordre de 10^{-7}M. Cette propriété hémagglutinante sert d'ailleurs souvent de test d'activité lors de la préparation et de la purification de la protéine.

SUMNER et HOWELL, dès 1936 *(249)* , ont expliqué ce phénomène par l'interaction de la molécule avec des sites spécifiques présents seulement à la surface des hématies de certaines espèces (lapin, mouton, chien, chat, cobaye, et rat) et pas d'autres (homme, porc). Pour ces auteurs, le site superficiel est constitué par une substance hydrophile qui, après la fixation de la Concanavaline A acquiert des propriétés hydrophobes avec neutralisation de charges électriques et agglutination. Ils soupçonnent que la partie réactive du site récepteur est une glycoprotéine.

Cette activité hémagglutinante de la Concanavaline A est totalement inhibée par la présence dans le milieu réactionnel d'α-méthyl-D-glucopyranose 0,1M et de sérum de chèvre pur (PERSON et MARKOWITZ 1969 *(203)*).

2) - ACTION SUR DIVERS SYSTEMES BIOLOGIQUES

La Concanavaline A donne une réaction de précipitation avec de très nombreuses

substances par un mécanisme qui se ramène le plus souvent, bien que de façon parfois non évidente, à une fixation de la protéine sur des sites exposés de nature glucidique.

SUMNER et HOWELL *(249)* ont obtenu une réaction de précipitation avec le sérum de nombreuses espèces de mammifères, sans d'ailleurs pouvoir mettre en évidence de relation entre l'agglutination des hématies et la précipitation du sérum au sein d'une même espèce. Ils précipitent également les mucoprotéines de la salive et du suc gastrique ainsi que du blanc d'oeuf et les lipoprotéines du jaune d'oeuf. Enfin, ils firent agglutiner avec la Concanavaline A des émulsions d'huiles végétales et animales dans l'eau, même après stabilisation par ébullition prolongée.

La Concanavaline A réagit avec certaines préparations d'acides nucléiques et avec certaines endotoxines microbiennes (DOYLE et coll. 1968 *(71)*).

CLARKE et DENBOROUGH (1971 *(48)*) utilisent une réaction de précipitation par la Concanavaline A pour reconnaître les individus dits "sécréteurs" dont la salive et le suc gastrique contiennent des glycoprotéines solubles dans l'eau et porteuses des spécificités antigèniques du type ABH.

GOLDSTEIN et coll. (1969 *(105)*) montrent que la Concanavaline A précipite avec des Ig M monoclonales purifiées et LEON (1967 *(149)*) prouve que si elle ne réagit qu'avec les Ig G de moins de 5% des sérums humains normaux, elle précipite, au contraire, avec une grande majorité de sérums provenant de malades porteurs de myélomes de type G. NORDIN et coll. (1969 *(188)*) tirent parti de cette propriété pour distinguer les cellules productrices d'Ig M, de celles produisant des Ig G. LEON et YOUNG (1970 *(150)*) emploient les propriétés de polyvalence de la Concanavaline A pour sensibiliser avec des polysaccharides des hématies de moutons en vue de leur utilisation pour des réactions d'hémagglutination passive.

Enfin, en 1967, LEON *(149)* a montré que la Concanavaline A réagissait avec les fractions du complément sérique.

II TOXICITE

De nombreuses expériences impliquent l'injection simultanée à l'animal de Concanavaline A et d'autres éléments moléculaires ou cellulaires. Il est donc intéressant de connaître avec précision l'action directe du produit, et en particulier sa toxicité sur l'animal de façon à pouvoir faire la part de ce qui revient en propre à l'élément testé.

D'un point de vue plus fondamental, il est important d'avoir une idée de l'action d'une lectine sur un organisme vivant.

La Concanavaline A n'est toxique par voie veineuse chez le lapin qu'à des doses relativement fortes. Des quantités de l'ordre de 3,5 mg par kg de poids entraînent la mort de l'animal en 48 heures sans provoquer d'agglutination intra-vasculaire et il faut atteindre des doses de 7 à 8 mg par kg pour observer la mort rapide de l'animal et une agglutination intra-vasculaire massive des hématies (SUMNER et HOWELL 1936 *(249)*). Le pouvoir toxique serait lié directement à l'action hémagglutinante.

SHOHAM et coll. (1970 *(277)*) ont montré que la Concanavaline A injectée à l'animal par voie sous-cutanée provoquait une réaction d'abcédation et de nécrose au point d'injection.

Nos propres expériences ont confirmé ces différentes données.

III PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

1) - GENERALITES

Les interactions entre la Concanavaline A et les différentes classes d'immunoglobulines normales et pathologiques et les fractions du complément sérique ont été envisagées dans un paragraphe précédent.

Si la Concanavaline A diffère des anticorps vrais en ce sens que sa biosynthèse n'est pas induite par contact avec une substance immunogène, d'où le terme générique de lectine proposé par BOYD (1953 *(38)*), elle n'en possède pas moins plusieurs propriétés des anticorps immuns. De nature protéique, elle interagit, en effet, comme l'ont montré des techniques de dialyse à l'équilibre, avec un certain nombre de substances de faible poids moléculaire portant un motif moléculaire précis grace à des sites spécifiques de fixation. La spécificité de ce phénomène, quoique moins étroite que celle généralement admise pour les anticorps, n'en est pas moins réelle et le grand nombre d'interactions contractées par la protéine n'est dû qu'au caractère commun et répandu des motifs biochimiques qu'elle reconnaît.

Testée par la méthode de double diffusion en gélose d'OUCHTERLONY (1953 *(196)*), la Concanavaline A donne des lignes de précipitation nettes avec certains polysaccharides et certaines glycoprotéines (GOLDSTEIN et SO 1965 *(104)*). Des résultats du même ordre sont obtenus par PERSON et MARKOWITZ (1969 *(203)*) en utilisant la méthode immunoélectrophorétique de GRABAR et WILLIAMS (1953 *(108)*). Ces différentes réactions sont inhibées par la présence de molécules hapténiques spécifiques, en particulier l'α-méthyl-D-glucopyranose.

Comme telle, la réaction de la Concanavaline A avec le glycogène peut servir de modèle idéalisé pour l'étude fondamentale de la réaction immunologique antigène-anticorps et la connaissance de ses changements conformationnels lors de ces interactions

peut aider à mieux connaître le structure des anticorps immuns (AGRAWAL 1968 et PFLUMM 1971 *(3 , 205)*).

2) - POUVOIR IMMUNOGENE

PERSON et MARKOWITZ (1969 *(203)*) ont montré que la Concanavaline A est immunogène chez la chèvre quel que soit le procédé par lequel elle a été préparée et purifiée.

L'activité anticorps se retrouve dans la fraction Ig G à l'immunoélectrophorèse et le complément se fixe sur le complexe Con.A-sérum anti-Con.A. La réaction est ici une réaction immunologique vraie ; elle n'est pas inhibée par l'α-méthyl-D-glucopyranose ; elle coexiste pour les hautes concentrations en Concanavaline avec la réaction non spécifique.

Ces expériences montrent que les sites responsables de la fixation des sucres sur la Concanavaline A sont différents des sites antigéniques induisant la synthèse et réagissant avec les anticorps. Les deux réactions paraissent complètement distinctes, la Concanavaline A pouvant réagir avec un polysaccharide et avec une immunoglobuline . La seconde réaction est cependant beaucoup plus spécifique que la première et elle se produit pour des concentrations bien inférieures en molécules réactives.

3) - ACTION SUR L'IMMUNITE A MEDIATION CELLULAIRE

MARKOWITZ et coll. (1969 *(166)*) ont obtenu une très sensible augmentation de la durée de survie de greffes cutanées chez la souris après traitement prolongé des animaux par des injections intra-péritonéales de Concanavaline A. Ils concluent à une action immuno-suppressive de cette protéine et en particulier à une action suppressive sur l'immunité à médiation cellulaire.

Cette observation est confirmée par PERLMANN et coll. (1970 *(202)*) qui font état d'une inhibition du pouvoir cyto-toxique des lymphocytes traités par la Concanavaline A.

Au contraire, SCHWARTZ et coll. (1970 *(222)*) ont montré que des lymphocytes de cobaye incubés avec de la Concanavaline A et injectés dans le derme d'autres cobayes produisent des lésions cutanées inflammatoires non attribuables, selon eux, à l'action directe de la Concanavaline A. De plus, SCHWARTZ et WILSON (1971 *(223)*) ont démontré que des lymphocytes provenant des ganglions et de la rate de cobayes non immunisés deviennent cytotoxiques pour les fibroblastes de souris en culture après incubation avec la Concanavaline A. Cet effet cytotoxique est inhibé par l'α-méthyl-D-glucopyranose ce qui confirme la responsabilité de la lectine dans le phénomène. Enfin,

STAVY et coll. (1971 *(236)*) obtiennent les mêmes résultats avec des lymphocytes de rat incubés pendant 72 heures avec de la Concanavaline A à la concentration de 50μg par ml. Ils observent, de plus, une transformation blastique de ces cellules lymphoïdes, observation confirmée par WILLIAMS et COULSON (1971 *(271)*) qui obtiennent 20°/o de transformation en 72 heures sur des lymphocytes cultivés dans un milieu privé de protéines et contenant 10μg par ml de Concanavaline A. La morphologie des cellules blastiques est identique à celles induites par la phytohémagglutinine de Phaseolus vulgaris.

IV ACTION SUR LA PHAGOCYTOSE ET LA DIVISION CELLULAIRE

En incubant des macrophages obtenus pas irritation péritonéale chez la souris avec une solution de Concanavaline A à 200 μg par ml pendant 20 minutes, BERLIN (1972*(30)*) a observé une diminution de l'ordre de 50 °/o de l'activité phagocytaire de ces cellules. Il démontre que cet effet n'est pas attribuable à une action toxique ou à une baisse de la mobilité cellulaire.

Il pense que la fixation des molécules de Concanavaline A sur des sites récepteurs de surface s'accompagne d'une modification de cette surface qui la rend inapte à adsorber puis à être le siège des processus d'endocytose responsables de la pénétration des particules dans le cytoplasme de la cellule.

Par ailleurs, WECKSLER (1968 *(264)*) et BECKERT et SHARKEY (1970 *(23)*) ont décrit un effet mitogène des extraits bruts de Canavalia ensiformis et de la Concanavaline A sur les lymphocytes du sang périphérique de lapin. Les petits lymphocytes cultivés en présence de Concanavaline A sont transformés en grandes cellules mononuclées de 25 μ de diamètre environ dont le noyau volumineux contient plusieurs nucléoles et dont le cytoplasme est basophile.

Cette activité mitogénique semble donc tout à fait comparable à celle de la phytohémagglutinine de Phaseolus vulgaris qui a été très étudiée en raison de son utilisation dans le test de transformation blastique en Immunologie. Pour les deux lectines, la fixation d'une molécule protéique sur un site de la surface cellulaire semble suffisant pour induire une modulation régressive de la cellulecible et pour la faire entrer en division (sans savoir avec précision encore s'il s'agit d'une induction positive ou d'une dé-repression). Il faut noter cependant que cette action n'a rien de spécifique : toute molécule capable de se fixer sur la surface peut avoir un effet analogue et le sérum anti-lymphocytaire a cette propriété.

V ACTION SUR LES TUMEURS CONSTITUEES

SHOHAM et coll. (1970 *(227)*), par injection de 10 à 20 mg de Concanavaline A dans des tumeurs constituées du hamster, obtiennent une régression importante de la

taille de ces tumeurs, amélioration se maintenant pendant plus de 100 jours pour certains animaux.

Nos propres expériences, menées de façon en apparence identique sur des animaux de la même espèce, n'ont pas confirmé ces résultats.

VI ACTION AGGLUTINANTE SUR LES CELLULES TRANSFORMEES

La propriété la plus intéréssante de la Concanavaline A, celle, en tout cas, qui est la plus étudiée actuellement, est son action sur certaines cellules ayant subi une transformation maligne et qui se traduit surtout par une agglutination de ces cellules.

Cette lectine est sans action sur les cellules eucaryotes adultes normales. Ainsi, une culture de cellules normales détachée du verre par l'EDTA (acide éthylène-diamino-tétra-acétique, qui se comporte comme un chélateur du calcium et du magnésium et diminue ainsi l'adhésivité cellulaire) et mise en présence de Concanavaline A ne donne pas d'agglutination notable aux concentrations où celle-ci est habituellement utilisée (inférieures à 1 mg par ml). A des concentrations plus fortes, de l'ordre de 1,5 mg par ml, certaines lignées cellulaires normales peuvent être agglutinées.

Ces mêmes cellules normales deviennent fortement agglutinables, en présence de Concanavaline A, même à de très faibles concentrations en lectine (inférieures à 100 µg par ml) quand elles ont subi un traitement ménagé par des agents protéolytiques enzymatiques comme la chrymotrypsine, la papaïne et surtout la trypsine.

La Concanavaline A est également capable d'agglutiner :

– Certaines cellules pathologiques malignes, par exemple les leucocytes provenant de malades porteurs de leucémie myéloïde ou lymphoïde (INBAR et SACHS 1969 *(137)*).

– Les cellules ayant subi une transformation spontanée un vitro (BEREBBI et coll. 1971 *(29)*).

– Les cellules transformées par des radiations électromagnétiques et en particulier par les rayons X (INBAR et SACHS 1969 *(137)*).

– Les cellules transformées par certains agents carcinogènes chimiques et tout particulièrement le 3,4-benzopyrène et la diméthylnitrosamine (INBAR et SACHS 1969 *(137)*).

– Les cellules transformées par certaines virus oncogènes :

- à ADN, tels le virus polyome et le virus SV40 (INBAR et SACHS 1969 *(137)*)
- à ARN, comme le virus de ROUS (MOORE et TEMIN 1971 ; BIGUARD et VIGIER 1972 *(183, 33)*).

Il faut noter cependant que certaines cellules cancéreuses ne sont pas agglutinées, même en présence de très hautes doses de lectine. Ainsi le carcinome TA3 - NS n'est pas agglutiné même par des concentrations en concanavaline A dépassant 1,6 mg par ml (FRIBERG et coll. 1971 *(91)*) ni certaines cellules 3T3 transformées par le virus SV40 (OZANNE et SAMBROCK 1971 *(197)*).

Cette action est en fait plus complexe puisque la Concanavaline A s'est montrée capable d'agglutiner des cellules infectées par des virus non oncogènes :

- à ADN, tel le virus vaccinal (ZARLING et TEVETHIA 1971 *(280)*)
- à ARN, tels les orthomyxovirus (BECHT et coll. 1971, BECHT et Coll. 1972 *(20, 21)*), les paramyxovirus comme le virus de la maladie de Newcastle, les arbovirus comme le virus Sindbis, et les rhabdovirus comme le virus de la stomatite vésiculeuse (BECHT et coll. 1972 *(21)*).

La Concanavaline A se fixe sur l'envelope elle même de certains virus :

- à ARN comme l'ont montré CALAFAT et HAGEMAN (1972 *(44)*) en microscopie électronique.

MOSCONA (1971 *(184)*) et SIVAK et MOSCONA (1971 *(228)*) ont montré que la Concanavaline A agglutinait très fortement les cellules rétiniennes et les hépatocytes provenant d'embryons de poulet dissociés par l'EDTA. Les cellules gamétiques mâles et femelles et l'oeuf fécondé ne sont pas agglutinables, mais l'action préalable de la Concanavaline A pertube la fécondation et les premiers stades du développement embryonnaire (LALLIER 1971 *(148)*).

Une trypsination des cellules embryonnaires ou des cellules transformées diminue l'agglutinabilité au lieu de l'augmenter et majore la concentration en lectine nécessaire et le temps de latence du phénomène (INBAR et SACHS 1969 ; MOSCONA 1971 *(138,184)*).

Toutes ces actions sont inhibées de façon compétitive par l'α-méthyl-D-glucopyranose, cette substance se montrant capable non seulement d'empêcher l'agglutination mais également de dissocier des agglutinats déjà formés.

D'autres phytoagglutinines sont, comme la Concanavaline A, sans action sur les cellules normales et capables d'agglutiner de façon sélective les cellules embryonnaires et transformées, Citons en particulier ici :

– Une glycoprotéine découverte par AUB et coll. (1963 et 1965 *(13, 12)*) dans la lipase extraite du germe de blé où elle se trouve en tant qu'impureté. Cette lectine a un poids moléculaire de l'ordre de 26×10^3, elle a été purifiée par BURGER et GOLDBERG (1967 *(41)*) et son action est compétitivement inhibée par la N-acétyl-galactosamine (BURGER 1969 ; POLLACK et BURGER 1969 *(39,208)*).

– Une protéine tiré du soja qui se fixe sur des motifs moléculaires, possèdant un résidu de N-acétyl-galactosamine (SELA et coll. 1970 ; LIS et coll. 1969 et 1970

(224,155,154)). Cette substance est capable d'agglutiner les cellules de hamster transformées, mais les cellules de souris, de rat et les cellules humaines ne sont agglutinées qu'après un traitement prolongé par la pronase (SELA et coll. 1970 *(224)*).

– Une agglutinine tirée du ricin dont l'action est inhibée par la présence de molécules de D-galactose ou de L-arabinose (NICOLSON et BLAUSTEIN à paraître).

VII AUTRES PROPRIETES

1 - ACTION SUR LES CARACTERES DE CULTURE

POLLACK et BURGER (1969 *(208)*) ont montré que l'agglutinabilité par les lectines de cellules transformées par le virus SV40 varie dans le même sens que la densité de saturation des cellules en culture.

Cette action de la Concanavaline A sur la régulation de la croissance en culture est confirmée par BURGER et NOONAN (1970 *(42)*).

Ces auteurs, en effet, remarquent que la trypsination ménagée de cellules normales leur fait perdre, de façon transitoire, l'inhibition de contact. Au contraire, le traitement d'une culture cellulaire transformée ou trypsinée par de la Concanavaline A rendue monovalente par action douce de la chymotrypsine est capable de rétablir l'inhibition de contact et de rendre des caractères culturaux d'apparence normale.

Il faut noter de plus que FOX et coll. (1971 *(90)*) en utilisant une lectine différente de la Concanavaline A marquée par la fluorescéine ont mis en évidence des modifications cycliques de la surface cellulaire en rapport avec le cycle mitotique. Les cellules de souris 3T3 infectées par le virus polyome fixent l'agglutinine du germe de blé de façon permanente, tandis que ces mêmes cellules normales ne la fixent que pendant la mitose.

Enfin, SHOHAM et coll. (1970 *(227)*) ont montré que la Concanavaline A avait une toxicité plus grande, in vitro, pour les cellules transformées que pour les cellules normales.

2 - ACTION SUR LA MOBILITE DES CELLULES TUMORALES

FRIBERG et coll. (1971 *(91)*) en utilisant une méthode inspirée du test d'inhibition de la mobilité des macrophages, ont montrée que la Concanavaline A utilisée à des concentrations sub-agglutinantes (de l'ordre de 3 à 6 μg par ml) inhibe de façon significative la migration in vitro de cellules tumorales. Cette action est inhibée par l'α-méthyl-D-glucopyranose.

Le mécanisme de cette action n'est pas connu. Il ne s'agit pas d'une agglutination avec formation de blocs de cellules peu mobiles puisque la Concanavaline A est utilisée à doses non-agglutinantes. Il ne s'agit pas non plus d'un effet toxique direct (dose et durée trop faible). Il s'agit très probablement d'un effet sur la fonction locomotrice de la cellule elle-même.

B – EXPERIENCES PRELIMINAIRES

TOXICITE CHEZ L'ANIMAL

I - TOXICITE LOCALE

II - TOXICITE GENERALE

PROPRIETES IMMUNOGENES

ACTION ANTI–TUMORALE DIRECTE

ACTION SUR LA TUMORIGENICITE IN VIVO

EXPERIENCES PRELIMINAIRES

En vue de l'utilisation de la Concanavaline A dans notre expérimentation personnelle, nous avons été amenés à effectuer un certain nombre d'expériences préliminaires, afin de compléter les données de la bibliographie et, éventuellement, de les vérifier sur nos systèmes expérimentaux.

Nous nous sommes ainsi spécialement attachés à l'étude de quatre propriétés précises de la Concanavaline A, qui nous ont paru particulièrement intéressantes :

- La toxicité chez l'animal, et en particulier chez le hamster doré,
- Les propriétés immunogènes chez le hamster,
- L'action antitumorale directe,
- L'action sur la tumorigénicité in vivo

A – LA TOXICITE CHEZ L'ANIMAL

I - TOXICITE LOCALE

Nos propres expériences ont confirmé les résultats de la littérature.

Dans un premier temps, nous avons testé l'action de faibles doses de Concanavaline A adsorbée à la surface de cellules vivantes homologues normales.

Dans ce but, nous avons utilisé des cellules de rein de hamster doré adulte, obtenues par trypsination de la zone corticale de l'organe. Des suspensions à 1×10^6 cellules par ml sont mises en présence, volume à volume pendant 30 minutes à la température du laboratoire, de solutions de Concanavaline A à 100, 200 et 400 μg par ml. Les cellules sont lavées deux fois avec du tampon phosphate 0,15 M pH 7,4 et la présence de la Concanavaline à leur surface est vérifiée par leur agglutination spontanée après le dernier lavage.

Douze hamsters dorés (Mesocricetus auratus) agés de 6 mois ont été mis en expérience, répartis en quatre lots. Trois lots de 3 animaux chacun recevaient en injection sous-cutanée dorsale 8×10^6 cellules traitées respectivement par les solutions de Concanavaline à 100, 200, 400 μg par ml. Un lot de 3 animaux témoins recevait la même quantité de cellules traitées seulement par du tampon phosphate.

Les animaux ont été gardés en observation continue pendant 9 mois. Nous n'avons jamais pu constater aucun signe et aucune toxicité ni locale ni générale n'a pu être décelée. Seuls, les animaux traités par les cellules recouvertes de la plus forte quantité de Concanavaline A ont présenté dans les jours suivants un oedème strictement localisé au point d'injection, très fugace, disparu en 48 heures et traduisant une réaction inflammatoire modérée. Nous en avons conclu que l'injection de doses très faibles de Concanavaline A fixée sur une surface adsorbante était parfaitement inoffensive chez le hamster adulte.

Dans un second temps, nous avons testé l'action de doses plus fortes de Concanavaline A libre, non adsorbée.

Nous avons administré à une série de 6 hamsters âgés de 8 semaines 8mg de Concanavaline A en solution dans 1 ml de tampon phosphate stérile. L'injection était faite par voie sous-cutanée dans la région ventrale de l'animal préalablement rasée.

Lors de la première injection, des phénomènes inflammatoires commencent à se manifester au bout de 36 à 48 heures en moyenne comportant tuméfaction, oedème et nette augmentation de la chaleur locale. On observe alors la formation d'un abcès typique reposant sur une base indurée de 2 cm de diamètre, rapidement fluctuant et qui s'ouvre à l'extérieur au 6ème-7ème jour après l'injection en moyenne, en créant une ulcération qui guérit spontanément en 18 jours en laissant une cicatrice indélébile et souvent rétractile.

Des injections de Concanavaline A sont répétées tous les mois à la même dose en des points différents et la même séquence se reproduit, précédée d'un temps de latence de plus en plus court de l'ordre de 12 à 24 heures et en suivant une évolution de plus en plus trainante sur 21 jours environ.

Nous n'avons jamais observé de toxicité générale quel que soit le nombre d'injections, et en particulier jamais d'effet léthal.

La toxicité locale, par contre, est importante et paraît pouvoir être expliquée par trois facteurs agissant dans le même sens :

– L'action nécrosante directe de la Concanavaline A sur les tissus animaux. Cette action toxique directe apparaît même pour des doses faibles et dès la première injection.

– Un phénomène de type ARTHUS, bien décrit par KIND et PETERSON (1968 *(146)*) chez la souris, dû à la précipitation intra-vasculaire autour du point d'injection des protéines du sérum, des hématies et peut-être des leucocytes. Il s'agit de lésions oedémateuses, ischémiques et hémorragiques qui s'atténuent quand les animaux sont traités par une moutarde à l'azote qui diminue le nombre des leucocytes. Ce phénomène se manifeste lui aussi dès la première injection.

– Un phénomène immunologique vrai, absent lors de la première injection, puis de plus en plus actif au fur et à mesure que l'animal s'immunise contre la protéine et synthétise des anticorps précipitants.

II - TOXICITE GENERALE

La toxicité générale du produit injecté par voie veineuse n'a pas été testée par nous, cette voie ne présentant pas d'intérêt direct pour notre propre expérimentation. On sait cependant que, par voie sanguine, d'autres phytohémagglutinines et en particulier celle tirée de Phaseolus vulgaris qui est parfois utilisée sous sa forme purifiée en clinique humaine, provoquent des signes généraux avec baisse de la tension artérielle, hyperthermie et bronchospasme.

Par voie sous-cutanée, nous n'avons jamais observé d'effet léthal même pour des doses de Concanavaline A atteignant 20 mg par animal.

B – PROPRIETES IMMUNOGENES

Nous avons nous même préparé un sérum anti-Concanavaline A chez le hamster.

La méthode d'immunisation adoptée a consisté à injecter chaque semaine pendant 3 semaines sous la peau des flancs de hamsters adultes une dose de 2 mg de Concanavaline A. Nous n'avons pas utilisé de substances adjuvantes de l'immunité. L'immunisation a été confirmée et entretenue par une série de 6 injections intra-péritonéales de 1 mg de produit faites chaque semaine après une période de repos de 4 semaines,

Les animaux ont été saignés de façon régulière par ponction du sinus veineux rétro-oculaire effectuée à la pipette Pasteur effilée.

Un pool de sérums a été constitué, qui a été conservé par addition de Merthiolate à 1/10000ème et stocké à -20°C au congélateur.

Ces sérums, testés par la technique de double diffusion en gélose nous ont montré que pour des concentrations élevées en Concanavaline A (10 et 5 mg par ml) la réaction non spécifique avec certains éléments de sérum coexiste avec la réaction spécifique et qu'on peut alors observer deux lignes de précipitation distinctes. Pour des concentrations plus faibles de la Concanavaline A (inférieures à 2,5 mg par ml) seule persiste la réaction spécifique et une seule ligne de précipitation est visible. Le sérum préparé par nous donne des lignes de précipitation jusqu'à une dilution de 1/64ème. (figure n° 1)

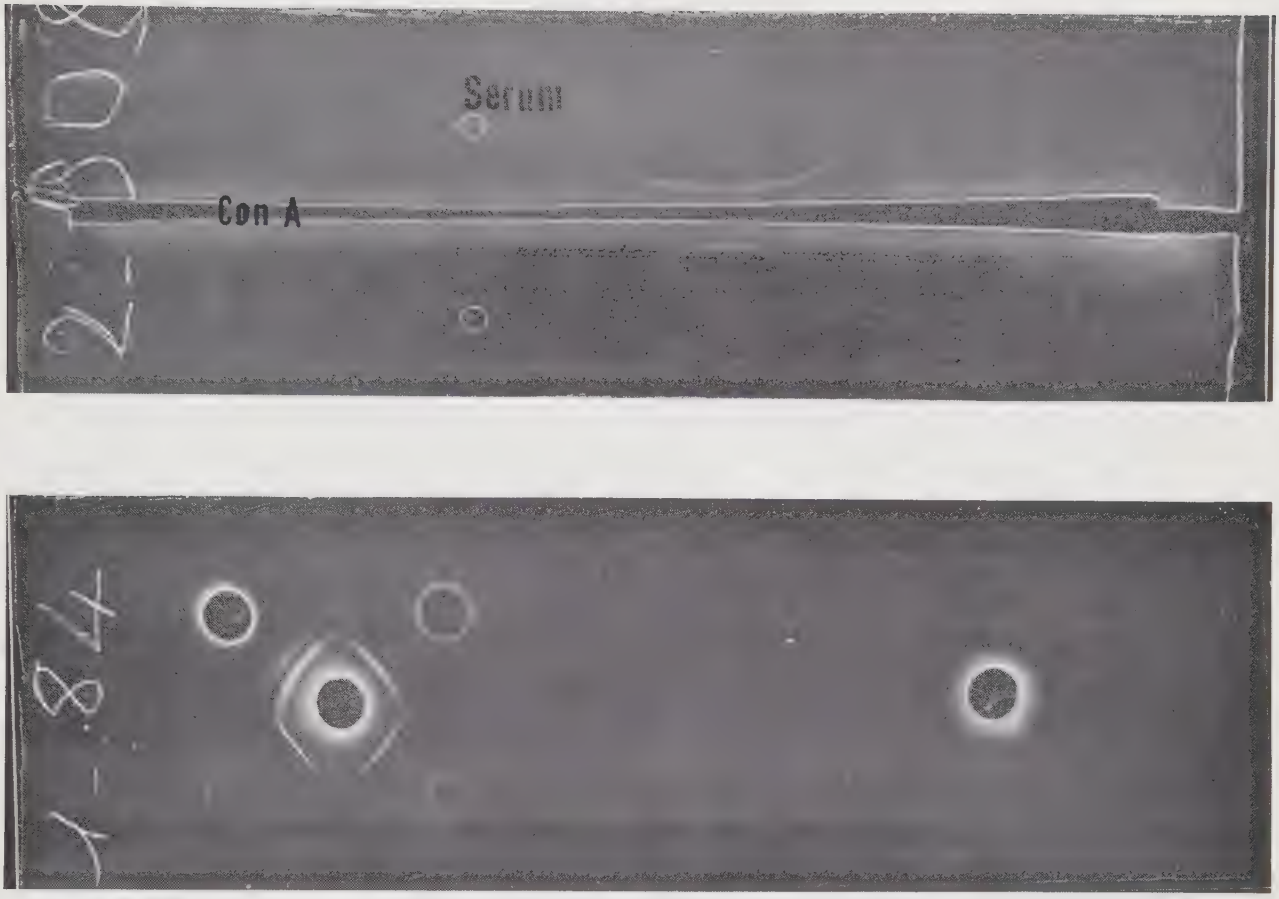


Figure N°1

POUVOIR IMMUNOGENE DE LA CONCANAVALINE A SERUM DE HAMSTER ANTI-CON. A.

a : IMMUNOELECTROPHORESE

b : IMMUNODIFFUSION

C – ACTION ANTI–TUMORALE DIRECTE

L'action anti-tumorale directe de la Concanavaline A a été testée sur des tumeurs artificiellement produites chez l'animal par injection sous-cutanée dorsale d'une quantité de cellules tumorales correspondant à un multiple de la DT50 (dose tumorale 50°/o : quantité de cellules provoquant une tumeur chez 50°/o des animaux inoculés), préalablement déterminée. Les cellules étaient obtenues par trypsination et séparation mécanique de tissu tumoral selon la technique décrite par DULBECCO et VOGT (1954 *(73)*).

Trois types de cellules ont été ainsi inoculées :

– Des cellules mélaniques provenant d'une tumeur induite chez le hamster nouveau-né par un carcinogène chimique, le diméthylbenzanthracène.

– Des cellules CT54, souche transplantable du hamster obtenue en première génération d'une tumeur induite par injection de 4×10^6 U.F.P. de virus polyome chez le hamster nouveau-né (le n° 54).

– Des cellules BHK 21 qui ont été étudiées dans un autre chapitre.

Vingt-deux animaux ont été mis en expérience, comportant une série de 12 souris lignée AKR, porteuses de tumeurs ayant 10 mm en moyenne et une série de 10 hamsters dorés, porteurs de tumeurs de 15 à 20 mm.

La Concanavaline A était utilisée à la dose de 10 mg pour les souris et de 20 mg pour les hamsters, en solution dans 0,5 ml de tampon phosphate. Elle était injectée directement dans la tumeur au moyen d'une aiguille de très petit calibre, type aiguille pour injection intra-dermique.

Les animaux témoins ne recevaient que 0,5 ml de tampon phosphate sans Concanavaline A.

Les résultats ont été reportés dans le tableau n° 2.

Onze animaux sur vingt-deux sont morts avant les premières 24 heures. Les onze autres animaux dont la survie a été suffisante pour permettre une étude de l'évolution ont parfois permis de voir une nécrose de la partie centrale de la tumeur mais n'ont jamais montré de régression véritable.

Il semble que chez les animaux porteurs de tumeurs évoluées et en mauvais état général, la toxicité de la Concanavaline A soit plus grande que chez les animaux sains et qu'elle soit dans ce cas susceptible d'avoir un effet léthal de façon très rapide à des doses non toxiques pour les animaux en bonne santé. Cet effet toxique a éliminé 50 °/o des animaux de notre expérience en moins de 24 heures. Chez les animaux ayant survécu à

l'injection, la Concanavaline A ne nous a paru n'agir que par son effet nécrosant, manifeste pour les tissus sains et augmenté dans ce cas par l'ischémie et l'infection intra et péri-tumorale. Le centre de la tumeur, déjà nécrotique et hémorragique avant l'injection est lysé par la Concanavaline A injectée et l'examen anatomo-pathologique ne révèle qu'une nécrose sans caractère particulier.

A aucun moment la substance injectée ne nous a semblé avoir d'effet anti-tumoral réel. Nous n'avons jamais observé de regression de la taille des tumeurs et les animaux qui avaient survécu à l'injection ont évolué, comme les animaux témoins vers l'augmentation de taille de leur tumeur et la mort.

TABLEAU N° 2

Hamsters	Souris	Résultat
3	4	Mort immédiate (moins de deux heures après inoculation)
2	2	Mort retardée (dans les 24 heures suivant l'inoculation)
5	6	Survie dépassant deux semaines

RESULTATS DE L'INJECTION INTRA–TUMORALE DIRECTE DE LA CONCANAVALINE A.

D – ACTION SUR LA TUMORIGENICITE IN VIVO

Les données de la bibliographie semblent démontrer que le traitement par la Concanavaline A est capable de rétablir des propriétés de surface d'apparence normale et permette, en tout cas, à la cellule de se comporter de façon normale.

Il était intéressant de savoir dans quelle mesure le traitement par la Concanavaline A de cellules de tumorigénicité connue pouvait influencer leur capacité de provoquer des tumeurs chez l'animal.

L'expérience a porté sur 36 hamsters dorés (Mesocricetus auratus) des deux sexes agés de 6 mois.

Nous avons utilisé trois souches cellulaires différentes :

– La souche RPMI 87341 mélanome spontané du hamster mis en culture, qui a été utilisée à sa 26ème subculture et dont la DT50 est de l'ordre de 5×10^4 cellules.

– La souche CT54, déjà décrite précèdemment (DT50 : de l'ordre de 18×10^4 cellules), employée à un second passage in vitro.

– La souche BHK21/C13 (DT50 de l'ordre de 1×10^6 cellules).

L'examen anatomo-pathologique des tumeurs a été pratiqué par le Professeur H. BONNEAU et l'étude ultrastructurale par C. DE MICCO-PAGIS.

Les cellules sont placées en suspension à la concentration de 10^5 par ml et mises en présence, volume à volume, d'une solution de Concanavaline A à 400 µg par ml. Le contact est maintenu pendant 30 minutes, à la température du laboratoire. La Concanavaline A est ensuite éliminée par 2 lavages successifs avec du tampon phosphate 0,15M pH 7,4 suivis de centrifugation à 700 g pendant 5 minutes. On vérifie que la surface cellulaire est bien recouverte de Concanavaline A en s'assurant que les cellules s'agglutinent encore après le lavage. Les cellules sont remises en suspension dans du tampon phosphate.

Les cellules destinées aux animaux témoins sont seulement lavées dans du tampon phosphate et suspendues dans le même tampon.

Chaque animal reçoit une dose de cellules correspondant à 2 DT50, en suspension dans 1 ml de tampon, par voie sous-cutanée dans la région dorsale.

Ils sont ensuite surveillés et palpés trois fois par semaine en recherchant la tumeur et d'éventuelles adénopathies.

Les animaux étaient répartis selon le tableau n° 3.

TABLEAU N° 3

Souche cellulaire	Nombre d'animaux testés	Nombre d'animaux témoins
RPMI 87341	6	4
CT54	12	6
BHK12/C13	4	4
TOTAL	22	14

REPARTITION DES ANIMAUX POUR L'EXPERIENCE D'INHIBITION DE LA TUMORIGENICITE

Les résultats obtenus différent avec la souche cellulaire considérée. Ils sont reportés dans le tableau n° 4.

TABLEAU N° 4

	RPMI 87341		BHK 21		CT 54	
	Témoins	Con. A	Témoins	Con. A	Témoins	Con. A
Délai d'apparition (en jours)	28	21	35	30	30	24
Taille de la tumeur (enmm) 6 semaines après inoculation	8	12	5	6	12	15
Délai de récidive après tumorectomie (en jours)	28	14			24	18
Aspect Anatomo-pathologique	Banal	Atypique (+)	Banal	Atypique (+)	Banal	Atypique (+++) Métastases

ACTION DE LA CONCANAVALINE A SUR LA TUMORIGENICITE

Avec la souche RPMI 87341, les 4 animaux témoins ont présenté des tumeurs de 8 mm de diamètre, d'aspect banal, en 28 jours en moyenne. Après tumorectomie, ces tumeurs récidivaient en 4 semaines environ.

Les 6 animaux tests, au contraire, ont présenté des tumeurs de 12 mm en 21 jours en moyenne. Ces tumeurs avaient un aspect hautement malin ; elles étaient très adhérentes et très hémorragiques. Après tumorectomie, la récidive est intervenue en 2 semaines environ.

Avec les cellules BHK 21, les 4 animaux témoins ont présenté des tumeurs de 5 mm en 5 semaines environ tandis que pour les animaux tests, ce temps paraissait sensiblement raccourci. De plus les animaux qui avaient reçu des cellules traitées développaient des tumeurs atypiques, très infiltrantes, détruisant le muscle en périphérie, présentant de nombreuses lacunes sanguines et une activité cellulaire anormalement importante pour ce type de cancer.

Enfin, en ce qui concerne la souche CT54, les 12 animaux tests ont développé des tumeurs de 15 mm en 30 jours en moyenne. Ces tumeurs étaient des fibrosarcomes réalisant des tumeurs largement ulcérées, rapidement adhérentes aux plans profonds, pénétrant à l'intérieur du thorax (jusqu'au coeur) et de l'abdomen, nécrotiques, infectées et hémorragiques.

De plus, et il s'agit là d'un fait hautement atypique, ces tumeurs ont donné dans 7 cas sur 12 des métastases fibrosarcomateuses, rénales dans 4 cas, pulmonaires dans 4 autres et très souvent multiples.

L'examen en microscopie électronique a révélé dans ce dernier type de tumeur un aspect sarcomateux et la présence de très nombreuses particules d'aspect viral.

Une expérience portant sur 40 animaux dont les défenses immunitaires avaient été déprimées par un traitement cortisonique a confirmé ces résultats.

LA LIGNEE CELLULAIRE

BHK 21

La lignée cellulaire BHK 21 ("Baby Hamster Kidney") est actuellement universellement utilisée dans les Laboratoires de Virologie et de Cancérologie expérimentale.

Elle a été produite par STOCKER et MAC PHERSON en mars 1961 *(245)* au "Medical Research Council Experimental Virus Research Unit" de GLASGOW Elle a depuis été très étudiée par ces mêmes auteurs (MAC PHERSON et STOCKER 1962 ; STOCKER et MAC PHERSON 1964 *(162, 246)* qui l'on décrite de façon trés complète.

Cette souche cellulaire a présenté pour nous une importance toute spéciale, compte tenu de ses interactions particulières avec le virus polyome. Nous nous proposons de rapporter ici la façon dont elle a été produite, ses principaux caractères, les modalites de sa culture in vitro et l'étude de sa transformation.

I – ORIGINE

Les cellules BHK 21 sont des cellules provenant de reins de 5 hamsters dorés âgés de 1 jour (de la portée n° 21).

En général, ces cellules se développent, en culture, pendant 8 semaines environ, avec une rapide prédominance des fibroblastes sur les cellules épithéliales, puis la croissance se ralentit et cesse.

Dans ce cas, après 30 jours et 3 subcultures, un échantillon a été stocké à -70°C dans un milieu contenant du glycérol pendant 8 jours, puis il a été remis en culture dans un milieu différent. Après 65 jours de culture, une soudaine poussée de croissance a été notée, avec une nette augmentation du rendement en cellules de chaque boite de culture. Cela a été confirmé au 67ème jour, quand un échantillon de 10^5 cellules forma un tapis confluent en une semaine dans une boite de Petri de 60 mm de diamètre.

Ces cellules sont à l'origine de toutes les cellules BHK 21.

Huit clones ont été isolés à partir d'un petit nombre de cellules cultivées en goutte pendante.

L'un deux, le clone BHK 21/C13 a été stocké à -70°C après 24 générations, c'est à dire quand la population a atteint le chiffre de 10^8 cellules. Il a été très étudié et constitue la source de toutes les cellules BHK 21 distribuées dans le monde.

II – CARACTERISTIQUES DES CELLULES BHK 21

Les cellules BHK 21 sont allongées, et présentent un aspect fibroblastique. Elles poussent parallèlement les unes aux autres.

En phase de croissance exponentielle, elles ont un temps de doublement moyen de 12 heures (MAC PHERSON 1963 *(160)*) quand elles poussent dans un milieu de EAGLE concentré contenant 10°/o de tryptose phosphate et 10°/o de sérum de veau.

Les cellules continuent à pousser après que la confluence soit atteinte ; la densité de saturation est de l'ordre de 10^6 cellules par cm2.

Les cellules supportent très bien le stockage à -70°C ou -196°C.

La garniture chromosomique de ces cellules est celle de cellules diploïdes de hamster doré mâle. Après 450 générations, le mode chromosomique est de 44 chromosomes. On trouve seulement 0,4°/o de cellules tétraploïdes.

L'inoculation d'un grand nombre de cellules BHK 21 à des hamsters adultes provoque l'apparition de fibrosarcomes après une période de latence de plusieurs mois. La DT 50 est de l'ordre de 10^6 cellules.

La souche BHK 21 est sensible à un grand nombre de virus, tant à ADN (Pox virus, Herpès virus) qu'à ARN (Myxovirus, Arbovirus, Rhabdovirus). Les poliovirus ne se multiplient pas sur cellules BHK21. Le virus Polyome induit une transformation mais aucune production de particule infectieuse ne peut être détectée. La transformation par le virus polyome ne modifie pas la sensibilité aux virus.

III – MUTANTS DE LA SOUCHE BHK 21

On a pu isoler de nombreuses mutations de la souche BHK 21.

1) - Mutants spontanés

– Mutants à haut degré de transplantabilité : par exemple le mutant BHK 21/Is 3 dont la DT 50 est de 10^2 cellules seulement.

– Mutants capables de pousser en suspension (BHK 21/13/Susp).

– Mutants formant des colonies en agar (BHK 21/13/Ag).

2) - Mutants transformés par le virus polyome

– Clone BHK 21/C13/Py6, transformé par le virus polyome, qui est caractérisé par sa haute transplantabilité (DT 50 : 60 cellules), son absence d'orientation en culture, son activité glycolytique augmentée et la présence d'un marqueur antigénique spécifique de virus.

– Clones tétraploïdes (BHK 21/Py Z)

– Clones dont la mobilité électrophorétique est augmentée (BHK 21/13/Py P)

– Clones adaptés à la croissance dans la cavité péritonéale du Hamster (cellules ascitiques) (BHK 21/13/Py 6/As).

– Clones adaptés à la croissance en agar (BHK 21/13/Py/Ag).

IV - CULTURE IN VITRO

Les cellules BHK21 sont actuellement cultivées dans un milieu synthétique dénommé "Milieu synthétique BHK 21" (EUROBIO) qui est un milieu de EAGLE modifié par STOCKER pour la souche BHK 21.

Ce milieu a la composition suivante :

– Milieu de EAGLE modifié ..... 80 %
– Tryptose phosphate ..... 10 %
– Sérum de veau ..... 10 %
– CO_2 (dans l'air) ..... 5 %

Les modification apportées au milieu de EAGLE sont données en annexe.

Ces cellules sont subcultivées de façon régulière après détachement et dislocation du tapis cellulaire par une solution de trypsine à 0,25 % et d'EDTA à 0,02 % (trypsine 1 volume pour versène 4 volumes).

Elles sont conservées par stockage dans l'azote liquide, en ampoules, dans du liquide BHK 21 contenant 25 % de sérum de veau et 5 % de glycérol, à la concentration de 2 à 5 x 10^6 cellules par ml.

ANNEXE COMPOSITION DU MILIEU DE EAGLE MODIFIE PAR STOCKER POUR LA CELLULE BHK 21

1) MILIEU DE EAGLE MODIFIE

NaCl	6,4 g
KCl	0,4 g
$Ca\ Cl_2$	0,2 g
$Mg\ SO_4,\ 7\ H_2O$	0,2 g
$Na\ H_2\ PO_4,\ 2H_2O$	0,14 g
Dextrose	4,5 g
Nitrate de fer	0,0001 g
L-glutamine	0,292 g
Rouge de phénol à 1 °/o	1,5 ml
$Na\ HCO_3$	2,75 g
H_2O bidistillée stérile QSP	500 ml

2) SOLUTION CONCENTREE DE VITAMINES

Chlorure de choline	0,05 g
Acide folique (dans 5 ml de NaOH N/10)	0,05 g
Nicotinamide	0,05 g
Panthoténate de calcium	0,05 g
Pyridoxal HCl	0,05 g
Thiamine HCl	0,05 g
Riboflavine	0,005 g
H_2O Bidistillée stérile QSP	100 ml

3) SOLUTION CONCENTREE D'ACIDES AMINES

L-Arginine	0,84 g
L-Cystine (dans 5 ml de Na OH N/10)	0,48 g
L-Histidine	0,384 g
L-Isoleucine	1,048 g
L-Leucine	1,048 g
L-Lysine	1,462 g
L-Phénylalanine	0,66 g
L-Thréonine	0,952 g
L-Tryptophane	0,16 g
L-Tyrosine	0,724 g
L-Valine	0,936 g
L-Méthionine	0,3 g
Inositol	0,07 g
Rouge de phénol à 1 %	0,04 ml
H_20 bi distillée stérile QSP	1000 ml

4) BOUILLON TRYPTOSE PHOSPHATE

Bouillon tryptose phosphate (DIFCO)	147,5 g
H_20 distillée	5000 ml

Le milieu de EAGLE final comprend :

Milieu de EAGLE modifié		500 ml
Solution concentrée d'acides aminés		50 ml
Solution concentrée de vitamines		4 ml
NaH CO_3	Jusqu'à coloration rouge orangé	
H_20 bidistillée	QSP	1000 ml

La stérilisation est effectuée sur filtre MILLIPORE (membrane GS de 0,22 μ). Le milieu ainsi préparé se conserve à + 4°C.

On utilise en fait le milieu dit ETC (EAGLE - Tryptose - Calf) qui comporte :

Milieu de EAGLE final	100 ml
Bouillon tryptose phosphate	10 ml
Sérum de veau	10 ml
Pénicilline	200 000 UI
Streptomycine	0,2 g
Mycostatine	0,02 g

LE VIRUS POLYOME

INTRODUCTION

RAPPEL SUR LES VIRUS DU GROUPE PAPOVA

PROPRIETES DU VIRUS POLYOME

METHODES DE PRODUCTION ET DE TITRAGE

INTRODUCTION

La théorie virale des tumeurs, énoncée en 1903 par BORREL, microbiologiste pastorien, a longtemps été combattue, dans l'impossibilité où fut son auteur d'en apporter les preuves expérimentales convaincantes.

Dès 1908, ELLERMAN et BANG ont décrit la transmission acellulaire de la leucémie des poules, puis, en 1911, ROUS, celle d'une tumeur solide maintenant appelée " sarcome de ROUS ".

OBERLING (1954 *(190)*) devait être l'un des plus fermes partisans de cette théorie, et il semble que ce soit avec raison, puisque, depuis cette époque, les faits n'ont cessé de s'accumuler en faveur de l'étiologie virale d'un certain nombre de tumeurs, tant bénignes que malignes.

Malgré les progrès immenses qui ont été réalisés ces dernières années dans les domaines de la Biologie et de la Pathologie cellulaire et de la Virologie, il n'a pas encore été possible jusqu'ici de prouver de façon véritablement indiscutable l'origine virale de tumeurs ou de leucémies humaines (sauf, peut-être pour le lymphome de BURKITT). Il est cependant permis de penser que, lorsque nous aurons une connaissance suffisante des tumeurs des animaux et de leurs agents et du phénomène de carcinogénèse virale in vitro, nous serons tout près d'atteindre le but en ce qui concerne les maladies humaines. C'est là tout l'intérêt des virus oncogènes et des tumeurs expérimentales.

Cette famille des virus oncogènes est composée de très nombreux virus qui ont en commun la propriété de produire des tumeurs chez l'animal à partir de filtrats acellulaires ou de transformer les cellules en culture in vitro. Leur nucléo-capside comporte de l'ARN (groupe des leucoses et sarcomes aviaires et groupe de leucoses et sarcomes murins) ou de l'ADN (groupe des virus polyome et SV40 ; groupe des virus des papillomes ; adénovirus 12, 18 et 31 ; certains herpès virus et certains Pox-virus).

Parmi ces derniers, les virus du groupe Papova dont le nom est composé de la première lettre des épithètes des virus papillomateux, polyome et vacuolisant sont responsables d'un grand nombre de tumeurs et ont été de ce fait particulièrement étudiés. C'est dans ce groupe qu'on doit classer le virus polyome, qui fait figure, comme ont pu le dire GORET et PROVOST (1966 *(107)*) de " maître-virus " oncogène et est devenu un modèle très étudié. Ce virus a particulièrement retenu l'attention de l'équipe du Service de Recherches du Centre Anti-Cancéreux de MARSEILLE, depuis une dizaine d'années, et c'est lui que nous avons étudié dans ce travail.

Nous nous proposons de rappeler ici de manière très brève les caractéristiques générales communes aux Papova-Virus puis d'étudier plus en détail les propriétés particulières du virus Polyome. Une étude exhaustive du génome viral et des phénomènes nucléaires et de surface accompagnant la transformation a été faite par G. MEYER (1971 *(173)*) dans une revue générale récente : nous nous sommes permis d'y faire de larges emprunts.

RAPPEL SUR LES VIRUS DU GROUPE PAPOVA

C'est MELNICK *(172)* qui devait, en 1962 proposer de réunir sous le nom de PAPOVA-VIRUS les virus des papillomes, du polyome et SV40. JOUBERT, par ailleurs, a proposé pour eux le nom de SCHIZO-VIRUS qui rend compte de leur caractère très ubiquitaire *(142)*. Ces virus ont chacun leurs constantes physiques et leurs caractéristiques biologiques particulières, mais ils semblent bien cependant posséder des points communs essentiels qui justifient leur réunion dans un groupe unique.

Selon la classification de LWOFF, HORNE et TOURNIER (1962) et LWOFF et TOURNIER (1966 *(158, 159)*) leurs caractéristiques principales sont les suivantes :

– Leur acide nucléique est de l'ADN (D) bicaténaire,
– La nucléocapside a une symétrie de type cubique (C),
– Elle est nue, sans peplos (N),
– Le nombre de 72 capsomères est actuellement le plus généralement admis, bien que le chiffre de 42 voire de 92 ait souvent été avancé.

Les principaux représentants de ce groupe sont :

– Le virus du papillome du lapin, isolé par SHOPE en 1933. Ce virus provoque chez le lapin cotton-tail une tumeur bénigne à type de verrue, pouvant se transformer spontanément en carcinome, transmissible d'animal à animal. Il s'agit d'un virus de 45 nm. de diamètre, contenant un ADN bicaténaire de 6×10^6 de poids moléculaire, non hémagglutinant, thermostable, transmissible à partir de filtrats acellulaires.

– Les virus des papillomes des autres animaux : papillomatose orale canine, papillomatose cutanée bovine, papillomatose génitale du porc, papillomatose orale du lapin domestique, papillomatose du cheval ; papillomatose humaine (verrue bénigne de l'homme).

– Le virus SV40 (virus simien 40 ou " Simian Virus 40"), isolé par SWEET et HILLEMAN (1960) et qui se trouve très fréquemment à l'état latent dans les reins des singes Rhesus et Cynomolgus utilisés pour les cultures cellulaires. Il s'agit d'un virus de 40 nm. de diamètre semblant n'avoir que 42 capsomères, à ADN bicaténaire. Sur cellules de reins de singes Rhesus, il se multiplie à de très hauts titres, sans provoquer d'effet cytopathogène. Il transforme par contre in vitro les cellules de hamster, de souris, de lapin et humaines.

– Le virus polyome, qui va faire l'objet du paragraphe suivant.

PROPRIETES DU VIRUS POLYOME

DECOUVERTE

ISOLEMENT – CULTURE IN VITRO

POUVOIR TUMORIGENE CHEZ L'ANIMAL

MORPHOLOGIE ET STRUCTURE – CARACTERES GENERAUX

- I - MORPHOLOGIE
- II - STRUCTURE
- III - CARACTERES GENERAUX
- IV - POUVOIR HEMAGGLUTINANT

PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

- I - LES ANTIGENES TUMORAUX INDUITS PAR LE VIRUS POLYOME
  - 1) Les antigènes de Transplantation
  - 2) L'antigène de surface
  - 3) L'antigène nucléaire
- II - POUVOIR IMMUNOGENE

LE GENOME VIRAL

INTERACTIONS AVEC LES CELLULES

- I - LE CYCLE LYTIQUE
- II - LE CYCLE TRANSFORMANT
  - 1) Généralités sur la transformation cellulaire par les virus oncogènes.
  - 2) La transformation par le virus Polyome
- III - LE CYCLE ABORTIF

PROPRIETES DU VIRUS POLYOME

A - DECOUVERTE

Au cours de ses recherches sur la transmission des leucémies de souris de souche AkR par des filtrats acellulaires inoculés aux souris C_3 H nouveau-nées GROSS (1951 *(113)*) avait remarqué que quelques animaux au lieu de développer des leucoses présentaient 2 à 3 mois plus tard des tumeurs d'un ou des deux côtés du cou qui grossissaient lentement jusqu'à former un gros collier entourant " de façon grotesque " le cou de ces animaux. L'aspect macroscopique en grappe de raisin de ces tumeurs était tout à fait caractéristique et très différent de toutes les tumeurs décrites jusque là chez la souris. Les animaux présentant des tumeurs demeuraient exempts de tout signe de leucémie ; le sang et la moelle étaient normaux et il n'y avait pas d'adénopathies. Le diagnostic anatomo-pathologique de ces tumeurs fut sans ambiguité : tumeur myo-épithéliale parotidienne. Plus tard, certaines d'entre elles devaient révéler des aspects de sarcomes et d'adénocarcinomes typiques.

Deux hypothèses pouvaient alors être faites sur l'origine de ces tumeurs :

– Ou bien l'extrait acellulaire contenant un virus leucémogène contenait de plus un virus contaminant,

– Ou bien la lignée AkR répondait de façon anormale au virus leucémogène.

Les expériences suivantes de GROSS (1953 *(114)*) devaient montrer que les filtrats acellulaires utilisés contenaient en fait deux virus oncogènes distincts : un agent leucémogène déjà connu et un agent nouveau qu'il appela " facteur de la tumeur parotidienne " responsable des tumeurs du cou et d'autres cancers. La filtration différentielle sur filtres de faible porosité et la centrifugation différentielle à 144.000 g. permirent de séparer l'activité leucémogène supportée par une particule de grande taille et de haut poids moléculaire de l'activité tumorigène supportée par une particule plus petite. De plus GROSS montra que l'agent leucémogène était relativement plus sensible au chauffage que l'agent tumorigène.

La preuve était ainsi administrée de la présence au sein de ces filtrats de deux virus distincts, différant notamment par la taille, le poids moléculaire et par leur sensibilité à la chaleur.

Dès lors, de très nombreux chercheurs devaient s'intéresser à l'étude de ce nouveau virus oncogène et en particulier STEWART (1953 *(237)*) qui reprit les expériences de GROSS en l'inoculant à des souris C_3 H/Hen qui présentèrent 8 à 10 mois après l'injection des tumeurs parotidiennes.

En raison du grand nombre d'espèces animales sensibles, STEWART et coll. (1958 (241)) ont proposé pour ce nouvel agent l'appellation de " Polyoma Virus ", traduit par virus du Polyome, ou plus simplement, virus Polyome.

B - ISOLEMENT - CULTURE IN VITRO

STEWART et EDDY (1957 (238)) les premiers, ont utilisé les cultures de cellules de reins de singe, qui étaient notamment employées pour la multiplication des virus poliomyélitiques, à la production du virus polyome. Ces cultures étaient ensemencées avec des extraits leucémiques provenant de maladies spontanées de la souche de souris AkR et de broyats de tumeurs parotidiennes induites par des filtrats acellulaires.

Sur cellules normales de rein de singe in vitro, seul le virus polyome est capable de se développer, la multiplication du virus leucémogène étant impossible. De plus, le potentiel oncogène du virus polyome était considérablement augmenté après passage en cultures de tissu, à condition d'effectuer un certain nombre de passages en série et d'attendre une période d'incubation d'environ deux semaines. Cependant, le rendement sur ce type de matériel restait relativement faible.

STEWART et EDDY (1958) et EDDY et STEWART (1958 (239, 80)) obtinrent de meilleurs résultats par utilisation de cultures cellulaires d'embryons de souris. La fréquence et la variété des tumeurs induites par le liquide provenant de ces cultures furent augmentées, ainsi que le titre du virus tandis que le temps de latence demandé pour l'induction des tumeurs était plus court. Par passage à l'animal, ces auteurs obtenaient des néoplasmes de la parotide dans 90 °/o des cas et d'autres tumeurs malignes dans 33 °/o des cas.

Le virus du polyome se multiplie également sur cellules provenant de Lymphome murin (RABSON et LEGALLAIS 1959 (212)). Dans des conditions analogues, BANFIELD et coll (1959 (16)) ont mis en évidence des particules virales intra et extra nucléaires.

WINOCOUR et SACHS (1959) et WINOCOUR (1963 (275, 273)) ont décrit une méthode de production mixte in vivo-in vitro par mise en culture de reins de souriceau de 7 à 8 jours ayant reçu une inoculation de virus polyome à la naissance.

Les techniques de production utilisées par nous seront décrites dans un chapitre particulier.

C - POUVOIR TUMORIGENE CHEZ L'ANIMAL

Le pouvoir tumorigène se révèle :

– Directement par inoculation du virus lui-même à des animaux immunologiquement incompétents, après un temps de latence allant de plusieurs semaines à quelques mois,

– Indirectement, par inoculation à des animaux adultes de cellules tumorales isologues transplantables.

Le virus produit en cultures de tissu, et présent à haut titre, provoque des tumeurs non seulement chez des souches de souris bien définies, mais également chez de nombreux autres animaux, et en particulier chez le hamster, chez le rat et chez le lapin (STEWART et coll. 1957 ; STEWART et EDDY 1958 et EDDY et coll 1959 *(238, 239, 84)*.).

Le virus polyome produit des tumeurs chez un grand nombre de souches de souris quand l'inoculation est faite à des animaux âgés de moins d'un jour. (STEWART et coll. 1958 *(241)*).

De plus, DAWE et coll. (1959 *(63)*) ont noté que des doses massives de virus administrées par voie intraveineuse à des animaux plus âgés ou à de jeunes adultes irradiés par 300 R sur tout le corps étaient capables de provoquer des tumeurs dans un pourcentage notable de cas.

STEWART et coll (1958) et STANTON et coll (1959 *(241, 235)*) ont pu noter un total de 23 lésions néoplasiques différentes provoquées par le virus polyome chez la souris. Et en particulier :

– Des tumeurs des glandes salivaires et des glandes muqueuses de la tête et du cou, les plus fréquentes, en particulier celles de la glande parotide présentes chez 100 °/o des animaux néoplasiques. On peut noter des métastases, surtout pulmonaires, indépendantes de la taille de la tumeur primitive, voire l'apparition de tumeurs primitives simultanées.

– Des lésions du cortex rénal et des sarcomes rénaux. Ces sarcomes sont envahissants, provoquant un blocage des calices avec hydronéphrose.

– Des thymomes épithéliaux.

– Des adénocarcinomes mammaires.

– Des carcinomes de la médullosurrénale.

– Des tumeurs osseuses.

– D'autres tumeurs : sarcomes sous-cutanés divers, tumeurs des follicules pileux, tumeurs de la thyroïde, carcinomes gastriques et carcinomes bronchiques. Toutes ces tumeurs sont dues au même virus comme l'ont montré STEWART et coll (1958 *(241)*) en utilisant la technique des plages de DULBECCO.

FIGURE N^{O} 2

LE VIRUS POLYOME

Figure 2 a et b

Virus polyome souche TORONTO small plaque, produit sur cellules d'embryons de souris, purifié par ultracentrifugation en gradient de chlorure de Césium.

Coloration négative par le phospho-molybdate d'ammonium.

Le cliché de gauche (a) représente des capsides pleines, le cliché de droite (b) des capsides vides sans ADN.

(x 300 000)

Figure 2 c

Culture de cellules d'embryons de souris (souche C3H) infectée par le virus polyome qui y a induit un cycle productif.lytique.

Cellule en voie de lyse montrant des amas de particules sphériques denses de type D et quelques formes allongées (flèche).

Seul le nucléole (Nu) ne présente pas de particules virales.

(x 25 000)

Clichés effectués par C. de MICCO-PAGIS dans le Service de Microscopie électronique du CRACM.

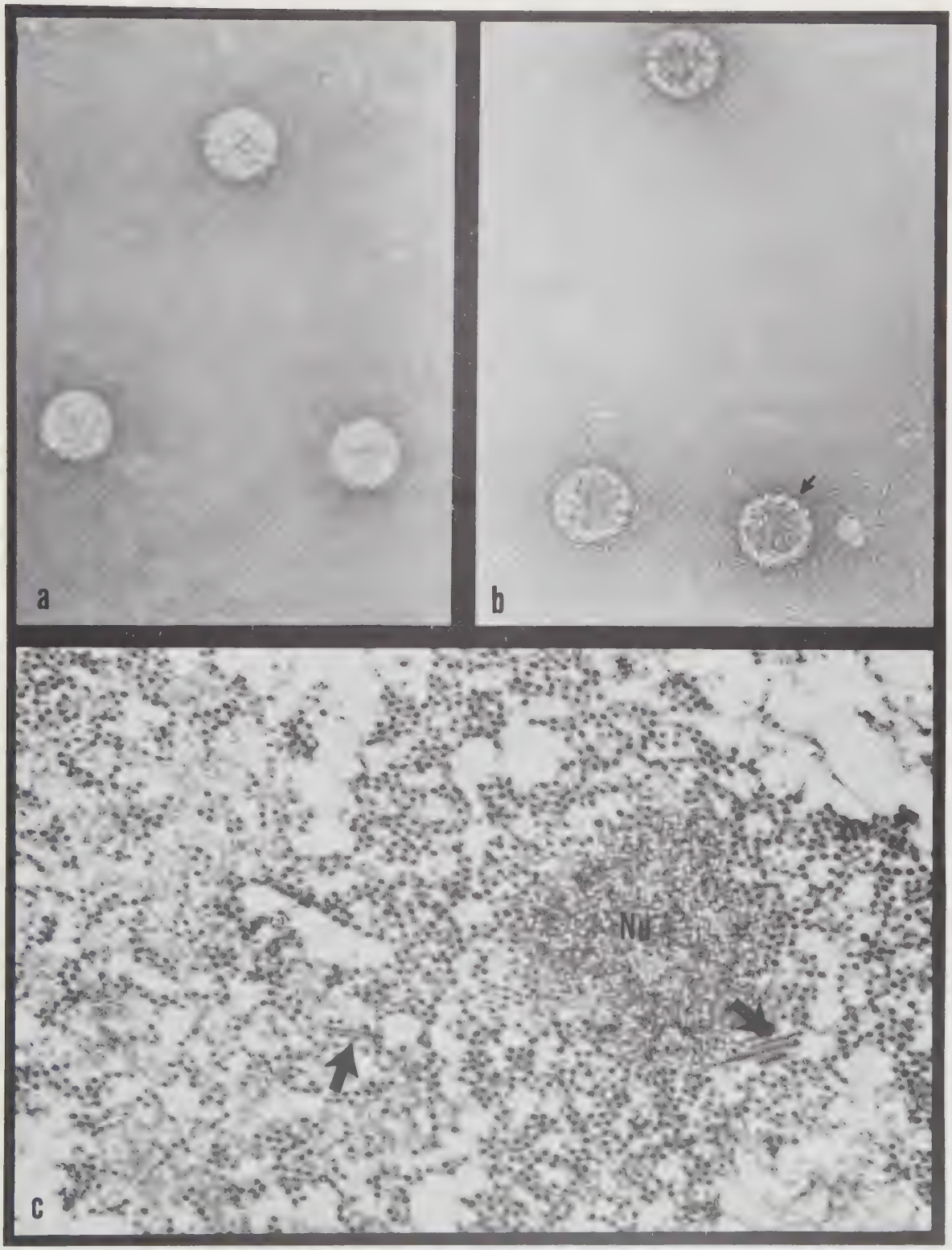


Figure Nº 2

Au service de Recherche du Centre anti-cancer de Marseille, Henri-Pierre BONNEAU (1971 *(35)*) s'est livré à une étude complète des tumeurs salivaires transplantables induites par le virus polyome chez la souris AkR.

Le virus polyome est également tumorigène pour le hamster nouveau-né après inoculation sous-cutanée de liquide surnageant de culture, et même semble-t-il pour le hamster adulte (BARSKI et coll 1962 *(18)*). Les animaux développent le plus souvent des sarcomes, en particulier des sarcomes rénaux, apparaissant 3 à 8 semaines après inoculation. On pourrait voir aussi, en cas d'inoculation plus tardive, des sarcomes du médiastin et des sarcomes de la région gastro-intestinale.

Le virus polyome provenant de cultures de tissu a pu également être transmis au rat nouveau-né chez lequel il provoque des tumeurs rénales ou des tumeurs multiples avec métastases.

Chez le lapin, enfin, EDDY et STEWART (1959 *(82)*) auraient observé des tumeurs dépourvues de malignité, regressant spontanément à 1 à 4 mois et ressemblant à des fibromes, tandis que GRAFFI et GIMMY (1962 *(109)*) auraient réussi à obtenir dans cette même espèce des tumeurs malignes métastasiantes.

Ainsi se trouve justifié très parfaitement le nom de l'agent du polyome donné à ce virus par les auteurs.

D - MORPHOLOGIE ET STRUCTURE - CARACTERES GENERAUX

I - MORPHOLOGIE (figure n^{o} 2)

Le virus polyome a fait l'objet de nombreuses études au microscope électronique.

BANFIELD et coll (1959 *(16)*) mettent en évidence sur coupes de cellules de lymphome murin infectées par le polyome des particules intra et extra cellulaires, sphériques de 27 à 35 nm. Par la technique d'ombrage, KAHLER et coll (1959 *(143)*) observent des particules également sphériques de 40 à 45 nm. BERNHARD et coll (1959 *(32)*) sur coupes fines de fibroblastes de souris infectés in vitro, mettent en évidence des particules sphériques, homogènes de 30 à 45 nm. qu'ils nomment particules de type D. et des formes filamenteuses, isolées ou groupées en faisceaux dans le noyau et dans le cytoplasme. Il est à peu près certain que ces formes filamenteuses sont des formes incomplètes de virus constituées d'assemblage de capsomères vides, sans acide nucléique, et se désintègrent secondairement en particules sphériques de type D tout à fait typiques. WILDY et STOKER (1960 *(270)*) ont appliqué la technique de coloration négative de BRENNER et HORNE à la détermination de la structure de la capside du virus polyome. Ces particules sont composées d'un centre dense aux électrons (nucléoïde) entouré d'une

membrane très fine. On peut mettre en évidence deux types de particules : des particules pleines d'un diamètre de 45 nm. en moyenne et des particules creuses d'un diamètre légèrement inférieur, de l'ordre de 42 nm.

CRAWFORD et coll (1962 *(57)*) se sont attachés à réaliser la séparation de ces deux types de particules du virus polyome. Celle-ci a été réalisée par centrifugation différentielle puis par centrifugation sur gradient de densité de chlorure de Césium. Ces différentes études permettent de retenir l'existence de particules pleines de 45 nm. de diamètre, ayant une densité de 1,32 et une constante de sédimentation de 238 S, contenant de l'ADN et possédant le pouvoir infectieux (virions complets) et des particules creuses, vides de 42 nm. de diamètre, dont les caractéristiques physiques sont 1,29 et 140 S sans ADN ni pouvoir infectieux, correspondants à des virions incomplets dépourvus d'acide nucléique et d'infectivité mais ayant conservé la structure caractéristique.

En fait il convient de citer ici des travaux plus récents (WEIL 1966 *(266)*) qui démontrent que, à côté des particules vides, ne contenant pas du tout d'ADN, il existe deux sortes de particules pleines. Certaines capsides, en effet, contiennent de l'ADN de virus polyome et possèdent le pouvoir infectieux tandis que d'autres ne contiennent que de l'ADN de souris et ne possèdent pas le pouvoir infectieux. Ces dernières particules ont été appelées " Pseudo-Virions " pour marquer leur ressemblance avec les virions complets mais mettre l'accent sur leur absence de pouvoir infectieux. Le pourcentage de pseudo-virions au sein d'une préparation de virus est évidemment tout à fait fondamental à connaître avant son utilisation.

II - STRUCTURE

WILDY et coll (1960 *(270)*), les premiers, après étude par la technique de coloration négative proposent pour le virus polyome une structure de type icosaédrique possèdant 42 capsomères groupés selon un ordre de symétrie 5,3,2. Les capsomères de chaque sommet sont des pentons et ceux de l'arête des hexons et la formule s'établit d'une manière très classique suivant la formule générale du système icosaédrique :

$$N = 10\,(n-1)^2 + 2 \text{ ou } N = 42 \text{ quand } n = 3$$

Ces résultats devaient être confirmés par un très grand nombre d'auteurs et faire autorité jusqu'aux travaux de MATTERN et coll (1962 *(169)*) et de CASPAR et KLUG (1962 *(45)*) qui, étant donné les incertitudes dans l'interprétation des micrographies obtenues par coloration négative pensèrent qu'une disposition à 72 ou 92 capsomères répondant à une formule du type :

$$N = 10\,n + 2 \text{ Avec } n = 7 \text{ ou } 9$$

serait aussi valable que celle de 42.

HOWATSON et CRAWFORD (1963 *(132)*) ont cependant, grâce à une technique de numération directe des capsomères, trouvé un nombre moyen s'approchant de 40, ce qui donne un argument sérieux en faveur d'une structure à 42 capsomères.

III - CARACTERES GENERAUX

Comme GROSS l'a montré dès ses premières expériences pour séparer le virus de la tumeur parotidienne de celui de la leucémie, le virus polyome est remarquablement stable. Il peut être conservé dans du sérum physiologique à + 4° C pendant plusieurs jours. On observe cependant une perte de l'activité si ce séjour est plus prolongé. GROSS a gardé le virus sous forme de filtrat leucémique congelé dans des ampoules de verre scellées à -70° C pendant plus d'une année. Le virus lyophilisé se conserve sans perte d'activité pendant 13 mois à + 4° C.

Le virus est également particulièrement résistant à la chaleur : il résiste au chauffage à 56° C et à 63° C et il est nécessaire de le soumettre à une température de 70° C pendant 30 minutes pour l'inactiviter (GROSS (1953 *(114)*).

Le virus polyome est résistant à l'éther et un traitement par l'éther pendant 24 heures à + 4° C permet de le séparer des virus leucémiques. EDDY et coll ont utilisé cette propriété pour protéger le virus en culture des contaminations bactériennes.

La trypsine à 0,25 °/o en solution dans du liquide de EARLE n'affecte pas le virus polyome. Il est cependant inactivé par l'alcool absolu et par le formol et ce dernier est utilisé en solution à 1/4000ème pour préparer des vaccins contre le virus (STEWART et coll 1959).

Les antibiotiques tels la Pénicilline et la Streptomycine sont utilisés couramment pour protéger les milieux de culture de la contamination et n'ont pas d'effet sur le virus. Par irradiation avec des rayons UV, on obtient une inactivation partielle qui sera étudiée ultérieurement.

IV - POUVOIR HEMAGGLUTINANT

On sait, depuis les travaux de HIRST (1941) que de nombreux virus agglutinent les hématies in vitro. Chaque virus a son spectre propre d'espèces d'hématies auxquelles il se combine, parfois limité aux érythrocytes des espèces sensibles à l'infection par le virus, parfois plus étendu.

EDDY et coll (1958 *(79)*) ont montré que le virus polyome agglutinait les hématies de hamster, de cobaye et d'homme.

Les hématies de très nombreuses autres espèces sont également sensibles : souris, poulet, singe (HARTLEY et coll 1959 *(124)*) grenouille et dindon (FOGEL et SACHS 1959). Par contre les hématies de mouton et de chat, de cheval, de vache et de pigeon ne sont pas du tout agglutinables.

Cette propriété permet une méthode de titrage du virus qui est actuellement très utilisée, parallèlement à la méthode des plages qui a été décrite précédemment. La technique précise sera étudiée ultérieurement.

L'hémagglutinine du virus polyome a été étudiée par RILLEY et CRAMER (1962 *(215)*) et par DANIEL et DELSAL (1962 et 1964 *(61,62)*).

Ces auteurs ont démontré que le pouvoir hémagglutinant était associé aux protéines capsidales. Cependant, à cause du nombre variable de particules vides sans ADN et de pseudo-virions contenant un ADN de souris non infectieux, le pouvoir hémagglutinant et le pouvoir infectieux sont en fait liés de façon très variable. Le titrage par la méthode d'hémagglutination ne paraît donc pas une méthode idéale de titrage du virus polyome, du moins en ce qui concerne son pouvoir infectieux.

PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES

I - LES ANTIGENES TUMORAUX INDUITS PAR LE VIRUS POLYOME

Il semble que le virus polyome soit capable d'induire au niveau des cellules qu'il infecte, et dans certaines conditions particulières, trois antigènes tumoraux qui ne sont pas des antigènes de structure virale. Ces néoantigènes ont été mis en évidence par ROWE et coll en 1958 *(217)* au moyen d'une réaction de fixation du complément. Leur nature et leur évolution à l'intérieur des cellules infectées ont été revues dans une étude générale au Centre Anti-Cancéreux de MARSEILLE par LHERISSON-STRABONI (1969 *(152)*).

Il est intéressant de rapporter ici les principaux résultats, de façon à pouvoir ensuite les confronter à notre propre expérimentation.

1) - Les Antigènes de Transplantation

En 1961, SJÖGREN et HABEL *(115)* séparément, mettent en évidence un néo-antigène porté par les cellules provenant de tumeurs induites par le virus polyome. Ce néo-antigène n'est jamais retrouvé à la surface des cellules normales et est responsable d'un phénomène de rejet d'isogreffe chez la souris et d'homogreffe chez le hamster adulte. Le protocole est simple : une dose initiale de virus est injectée à l'animal adulte, immunologiquement mature ; le virus se multiplierait dans certains organes de l'animal et confèrerait au moins de façon transitoire, ce caractère antigénique nouveau à un certain nombre de cellules. Lors d'une inoculation secondaire de cellules tumorales isologues, douées de la même antigénicité, il y a développement d'une réaction immunitaire (tant réaction à support humoral qu'à médiation cellulaire) aboutissant à un rejet de la greffe tumorale.

Le virus polyome est ainsi le premier virus ayant permis la mise en évidence d'un néo-antigène de groupe spécifique.

KLEIN (1966 *(147)*) a attribué les antigènes de transplantation localisés sur la surface cellulaire à une modification apportée par l'agent oncogène à des antigènes d'histocompatibilité faible.

HABEL (1961 *(115)*) a insisté sur le fait que les animaux devaient être immunologiquement matures pour présenter le rejet de greffe.

L'injection préalable du virus à des animaux nouveaux-nés ou à des animaux adultes irradiés par 400 R, ne provoque pas le phénomène de rejet. De même que l'injection secondaire de très grandes quantités de cellules tumorales débordant les mécanismes de défense immunitaire.

HARE (1967 *(122,123)*) a isolé à partir d'une souche de virus polyome LID 1, deux souches n'induisant pas l'antigène de transplantation (mutants défectifs pour l'antigène de rejet d'homogreffe).

Ces antigènes paraissent relativement labiles et sont de moins en moins souvent retrouvés au fur et à mesure des passages in vivo (DEFENDI et LEHMAN 1965 *(65)*).

MEYER et coll (1969 *(177)*) ont montré par des expériences d'irradiation ménagée du virus par les rayons UV que l'antigène de rejet de greffe est codé par une fraction du génome viral beaucoup plus petite (le sixième) de celle codant pour le pouvoir infectieux. Il semble que pour que le polyome protège contre l'homogreffe de cellules transformées, il faut qu'il soit lui-même capable de transformer les cellules in vivo, cellules qui constituent probablement le support antigénique. La nature de ces antigènes sera envisagée dans le paragraphe suivant.

2) - L'antigène de Surface (ou antigène de membrane ou Antigène "S")

La présence d'un néo-antigène à la surface des cellules infectées et transformées par le virus polyome a été prouvée par IRLIN (1967 *(139)*) et LHERISSON et coll (1967 *(153)*) en utilisant une méthode d'immunofluorescence. Elle a été confirmée par MALMGREEN et coll (1968 *(163)*).

Ce néo-antigène est spécifique du virus.

Sur les cellules BHK 21 infectées par le virus polyome et cultivées en présence de 10 °/o de sérum de veau, l'antigène de surface apparaît vers la 12me heure suivant l'infection ; le maximum de cellules fluorescentes (80 °/o) s'observe à la 18me heure en moyenne, et, vers la 48me heure, il ne persiste plus que 5 à 7 °/o de cellules positives qui le restent jusqu'au 12me jour (LHERISSON et coll 1967 *(153)*).

Au cours du cycle lytique sur cellules de souris, l'apparition de cet antigène est très précoce (IRLIN 1967 *(139)*). On peut le détecter dès la 4me heure suivant l'infection.

MEYER et coll (1969 *(177)*), ont montré que la moitié du génome viral infectieux était nécessaire à l'induction de l'antigène de surface.

Les rapports entre l'antigène de surface et les antigènes de rejet d'homogreffe sont encore obscurs. De très nombreux auteurs font de l'antigène S le support de l'antigène de transplantation ; d'autres demeurent plus nuancés. Il s'agit en tout cas de deux antigènes spécifiques du virus, siègeant à la surface de la cellule, et représentant une modification viro-spécifique de cette surface probablement en rapport étroit avec d'autres modifications (et en particulier avec la perte de l'inhibition de contact). Leur nature biochimique reste encore à découvrir avec précision ; il semble qu'il s'agisse des glycoprotéines de la glycocalix modifiées. Trois hypothèses peuvent expliquer la présence de ces antigènes de surface après l'infection virale :

– Le génome viral code directement pour la synthèse de novo de ces antigènes qui sont parfaitement absents et inconnus de la cellule normale.

– Il y a conversion d'une partie des glycoprotéines de la surface sous l'effet du développement du virus.

– Le génome viral déréprime un certain nombre de gènes cellulaires et entraîne la révélation de sites préexistants au niveau de la surface cellulaire.

Cette dernière hypothèse peut expliquer l'apparition d'antigènes carcinoembryonnaires. Elle peut aussi expliquer l'apparition de NEO-ANTIGENES de type FORSSMAN à la surface des cellules transformées (FOGEL 1963 ; O'NEILL 1968 ; ROBERTSON et BLACK 1969 ; MEYER et coll 1971 *(85, 193, 216, 175)*). Ainsi la cellule BHK 21/C13 est naturellement FORSSMAN-négative mais devient positive après transformation par le virus polyome. Un tel antigène n'est retrouvé que lors de la transformation définitive et stable de la cellule de hamster et n'apparaît pas lors du cycle abortif.

3) - L'ANTIGENE NUCLEAIRE (OU ANTIGENE TUMORAL OU ANTIGENE T)

Cet antigène a été mis en évidence :

– Par une réaction de déviation du complément utilisant comme antigène une préparation réalisée à partir de cellules tumorales induites par le virus polyome chez la souris, mais dépourvues de virus (ROWE et coll 1958 ; HABEL 1962 et 1965 ; DEFENDI et TAGUCHI 1966 *(218, 115 à 119, 66)*). Cette technique, la première utilisée, ne mettait pas en évidence la localisation nucléaire de l'antigène.

– Par une réaction d'immunofluorescence visualisant le néoantigène dans le noyau au moyen d'un antisérum de hamster rendu fluorescent (TAKEMOTO et coll 1966 ;

DEFENDI et TAGUCHI 1966 ; MEYER et coll 1967 *(251 et 252,66,176)*). L'antigène apparaît dans ce cas comme un ensemble de mottes couvrant tout le noyau à l'exception du nucléole. Des données de microscopie électronique utilisant des anticorps marqués par la peroxydase ont confirmé ces résultats en montrant que l'antigène était strictement localisé à l'intérieur du noyau et n'affectait pas le nucléole. (CESARINI et coll)

L'antigène T peut être détecté très tôt dans les stades précoces de l'infection cellulaire in vitro. TAKEMOTO et coll (1966 *(262)*) ont décrit la cinétique d'apparition de l'antigène nucléaire dans la cellule de souris infectée par le virus polyome à la dose de 100 UFP par cellule. Sa présence commence à être détectée à la 5me heure. Elle est maximum autour de la 18me heure après l'infection et tend à disparaître dès la 30me heure. MEYER et coll (1967 *(176)*) ont montré que sur cellules BHK 21, l'antigène T apparaît de façon extrêmement précoce dès la 3me heure après l'infection, devient maximum à la 6me heure et disparaît à la 48me heure, démontrant, avant STOKER (1968 *(243)*) l'existence d'une infection abortive de la cellule de hamster (système non permissif) par le virus polyome.

L'antigène T est viro-spécifique. Sa synthèse doit être codée par le génome viral. MEYER et coll (1969 *(177)*) ont montré en utilisant une méthode d'inactivation par les rayons UV que la moitié du génome viral était nécessaire pour coder la synthèse de l'antigène T, tandis qu'un cinquième de ce même génome est nécessaire pour induire la transformation.

On sait que l'antigène T est différent de l'antigène de capside du virus. Leur localisation commune au niveau du noyau cellulaire a posé le problème de leur distinction, mais des techniques d'immunofluorescence utilisant des antisérums spécifiques ont permis de les distinguer nettement l'un de l'autre.

La multiplicité d'infection intervient dans l'induction de ce néoantigène. La progression de la fluorescence est, en effet, sensiblement linéaire entre 2 et 64 UFP par cellule, pour arriver à une saturation asymptotique aux environs de 90 °/o (MEYER et coll 1967 *(178)*).

De très nombreuses équipes se sont attachées à l'isolement et à l'analyse de l'antigène nucléaire. La purification nécessite de grandes quantités de matériel (plus de 5 mg) et pose de gros problèmes. L'antigène T semble être de nature protéique. Son poids moléculaire semble se situer autour de 3×10^5 daltons (ZEMBALA et PTAK 1968 *(280)*) mais varie en fait avec le procédé d'isolement.

RAPP (1967 *(213)*) rapporte les caractéristiques suivantes :

– La synthèse de l'antigène T est inhibée par la puromycine et par l'actinomycine D.

– La synthèse n'est pas entravée par les inhibiteurs de la synthèse d'ADN (5 FUDR).

Il semble que l'antigène T ne constitue pas une preuve de la transformation puisqu'on le retrouve dans le cycle lytique et dans le cycle abortif. Par contre, il paraît être l'empreinte de la part du génome viral que l'on pense actuellement être intégrée au génome cellulaire. Il pourrait s'agir d'une substance protéique participant de façon non enzymatique aux mécanismes d'activation de la synthèse de l'ADN (STOKER 1968 *(243)*). Sa survenue précoce dans la cellule pourrait déréprimer certains mécanismes régulateurs de la division cellulaire et empêcherait la maturation des virions dans le cycle transformant.

II - POUVOIR IMMUNOGENE

Le virus polyome a par lui-même un pouvoir antigénique élevé. Injecté au lapin, au cobaye ou à la souris, le virus polyome provoque le dévelopement d'anticorps spécifiques. Le sérum de ces animaux neutralise, in vitro, le pouvoir tumorigène du virus et inhibe également le pouvoir cytopathogène et hémagglutinant du liquide de culture contenant le virus. On peut mettre en évidence in vitro des anticorps à des taux élevés chez tous les animaux sensibles au virus, porteurs ou non de tumeurs, ainsi que chez l'homme ayant été en contact avec lui.

F – LE GENOME VIRAL

La nature de l'acide nucléique du virus polyome a été décrite par DI MAYORCA et coll (1959 *(69)*). Le produit obtenu par la méthode classique d'extraction au phénol était insensible aux enzymes protéolytiques et à la ribonucléase ; il était par contre facilement inactivé par la desoxyribonucléase et fut ainsi identifié à l'ADN. WEIL (1961 *(265)*), ATANASIU et ORTH (1962) ont confirmé ce résultat. De plus, l'acide nucléique isolé possède le pouvoir infectieux et produit des effets cytopathogènes en culture de cellules d'embryons de souris et des tumeurs chez le hamster, comme le virus entier. C'est donc bien l'ADN seul, à l'exclusion de la capside protéique qui est responsable du pouvoir infectieux et transformant.

WINOCOUR (1963 *(273)*) a étudié le virus polyome après concentration d'extraits cellulaires par sédimentation et purification par centrifugation sur gradient de densité de CsCl. . Il obtient ainsi deux fractions principales de densité 1,339 g par ml et 1,297 g par ml en rapport avec les particules pleines et vides. Il évalue ainsi, par différence la concentration en ADN des particules pleines à 13,4 °/o en moyenne.

L'effet de la température sur l'absorption dans l'UV de l'ADN du virus a permis à CRAWFORD (1963 *(54)*) de mettre en évidence un pic aigu d'absorption entre 85 ° et

95° compatible avec une structure en double hélice. Cette structure en double hélice avait déjà été entrevue par MAYOR (1961 *(170)*) qui utilisait une méthode de fluorescence à l'orange d'acridine.

Ainsi, l'acide nucléique du virus polyome est un ADN bicaténaire répondant à la structure classique décrite par WATSON et CRICK. Il a un poids moléculaire moyen de 3×10^6 correspondant à environ 5.000 nucléotides.

Ces 5.000 nucléotides peuvent coder pour 1.700 acides aminés, ce qui correspond à 5 à 10 protéines différentes. On en conclut que le génome du virus polyome est constitué d'une dizaine de gènes au maximum.

Sa composition en nucléotides déterminée par la mesure de la densité de flottaison qui est en rapport directe avec la composition en guanine et cytosine et par des méthodes de dilution isotopique au 32 P est de l'ordre de 41 à 49 °/o de G-c et de 53 °/o de A-T. Ceci correspond à un rapport $\frac{A+T}{G+C}$ de l'ordre de 1,13, remarquablement élevé pour un virus et très proche du rapport trouvé dans les cellules de mammifères.

De très nombreux auteurs se sont attachés à l'étude des propriétés physico-chimiques de l'ADN du virus polyome (DULBECCO et VOGT 1963 ; CRAWFORD et coll 1964 ; BOURGAUX et coll 1965 ; THORNE 1968 ; BLACKSTEIN et coll 1969 *(74, 58, 37, 255, 34)*). Ils ont pu ainsi isoler trois formes de DNA différentes :

– Une forme I, de 20 S, d'un poids moléculaire de 3×10^6, constituée d'une molécule circulaire en double hélice, repliée sur elle-même (forme " super torsade "). Cette forme possède le pouvoir infectieux et transformant. Elle ne s'hybride pas avec l'ADN des cellules de souris normales. Elle est renaturable.

– Une forme II, de 18 S, portant également le pouvoir infectieux et transformant. Cette fraction est constituée d'une molécule circulaire fermée bicaténaire normale. Elle n'est pas renaturable.

– Une forme III, de 14 S, qui est une forme linéaire ne possèdant pas le pouvoir infectieux.

Cette dernière forme linéaire fait l'objet de très nombreuses discussions. Elle est capable de s'hybrider avec l'ADN et l'ARN provenant de cellules de souris et semble bien être une simple fraction du génome cellulaire emporté par un phénomène de type transduction. On ne connaît pas encore de façon précise le déterminisme ni le rôle de ces fragments d'acides nucléiques cellulaires au sein de l'ADN viral.

Ces différentes fonctions du génome viral ont été étudiées au moyen de procédés divers, et en particulier par l'isolement et l'étude de mutants thermosensibles du virus et par l'action des radiations sur les différentes propriétés.

L'étude de mutants thermosensibles a apporté de nombreuses précisions. ECKHART (1969 *(76)*) a isolé six mutants thermosensibles groupés en trois groupes de complémentation, tandis que DIMAYORCA et coll (1969 *(68)*) en ont trouvé quatre groupes. Ces mutants se répartissent d'une façon différente selon le mode d'étude qui leur est appliqué. Le plus important est certainement le mutant Ts-a, qui avait été primitivement isolé par FRIED (1965) *(92, 93)*) et qui appartient respectivement à la classe II de Eckhart et au groupe I de Dimayorca. La fonction Ts-a a été ensuite très étudiée, et en particulier par VOGT (1970 *(259)*) et par CUZIN et coll (1970 *(60)*) ; elle est impliquée dans l'infection lytique et dans le processus de transformation. Ce mutant est particulièrement intéressant pour l'étude de l'initiation de la synthèse du DNA par la cellule hôte, tant au cours des cycles lytique et transformant que du cycle abortif. Il a été démontré que cette initiation était dépendante du génome viral et FRIED (1970 *(94)*) a montré, en utilisant le mutant Ts-a que l'induction de la synthèse de l'ADN cellulaire et la transformation pouvaient être dissociées : le mutant Ts-a est thermosensible pour la transformation mais pas pour l'induction de la synthèse de DNA cellulaire.

Ainsi le génome viral code au moins pour les fonctions suivantes :

– Synthèse des protéines de la CAPSIDE

– Initiation de la DNA-polymérase virale et replication de l'ADN viral.

– Inhibition du represseur de la DNA-polymerase cellulaire et synthèse d'une thymidine kinase. (WEIL et coll 1965 *(267)*).

– Synthèse ou derepression des néoantigènes cellulaires viro-spécifiques et en particulier : antigène tumoral nucléaire T, antigène de surface S et éventuellement antigène de rejet d'homogreffe TSTA.

La part du génome viral impliquée dans ces différentes fonctions est la suivant (cité par MEYER 1971 *(173)*) :

– Infectivité :	100 °/o du génome viral
– Induction de l'antigène T :	50 °/o du génome viral
– Induction de l'antigène S :	50 °/o du génome viral
– Initiation de la synthèse de DNA cellulaire :	20 °/o du génome viral
– Induction de l'antigène de rejet d'homogreffe :	20 °/o du génome viral
– Pouvoir transformant :	20 °/o du génome viral

G - INTERACTIONS AVEC LES CELLULES

La principale caractéristique du virus polyome, comme de la majorité des virus oncogènes, est de se comporter de façon différente selon le type cellulaire sur lequel il est placé.

On peut ainsi distinguer trois possibilités essentielles :

– Les cellules dites permissives, sur lesquelles le virus effectue un cycle complet aboutissant à la production de nouveaux virions et à la lyse cellulaire. C'est le cycle infectieux ou cycle lytique.

– Les cellules non permissives, sur lesquelles le virus peut, selon les cas, soit effectuer un cycle incomplet sans production de nouveaux virions ni lyse cellulaire et avec " guérison " de la cellule au bout d'un temps variable (cycle abortif), soit provoquer une transformation définitive de la cellule, s'accompagnant de modifications génotypiques et phénotypiques particulières (transformation). Dans certains cas, cette transformation s'accompagne d'une petite production de virions infectieux, c'est la transformation productive (HANAFUSA 1969 ; FOGEL et SACHS 1970 *(120, 87)*).

I - LE CYCLE LYTIQUE

Ce cycle s'accomplit sur les systèmes cellulaires dits permissifs. Dans ce cas, il s'agit de cellules de souris, sur lesquelles le virus se multiplie avec un bon rendement et sur lesquelles il est le plus généralement produit.

WINOCOUR a pu démontrer que le cycle complet, à condition d'utiliser une multiplicité d'infection suffisante, était de 48 heures. En fait, il s'agit rarement d'un cycle unique et l'effet cytopathogène complet, avec les multiplicités d'infection courantes est de 5 à 10 jours.

Le cycle lytique comporte deux phrases distinctes qu'il convient de distinguer. La phase I correspond aux événements dits précoces qui se produisent avant la replication de l'ADN viral. Elle est caractérisée par la synthèse d'un ARN messager précoce spécifique du virus, par l'apparition de l'antigène T et par le phénomène d'initiation de la synthèse de l'ADN cellulaire. La phase I s'achève par la synthèse de l'ADN viral. Au cours de la phase II, ce dernier est utilisé comme matrice pour la synthèse de l'ARN messager tardif qui est produit en grandes quantités.

Cet ARN tardif code surtout pour la synthèse des protéines capsidales ; il est différent de l'ARN messager précoce.

L'entrée du virus dans la cellule se fait, après adsorption, par un phénomène de micro-pinocytose. Après un trajet de quelques microns, le virus est décapsidé dans le

cytoplasme et l'ADN viral est rapidement retrouvé au niveau du noyau cellulaire où il est en association étroite avec les chromosomes. De nombreux résultats suggèrent qu'au moins une molécule d'ADN viral est intégrée à l'ADN chromosomique cellulaire et que l'ARN messager précoce est transcrit à partir de cet ADN intégré. Une des premières modifications de la cellule après la pénétration du virus se situe au niveau du nucléole qui s'hypertrophie pendant la phase d'éclipse et présente un phenomène de ségrégation nucléolaire partiel.

Une synthèse d'enzymes a alors lieu, nécessaire à la replication de l'ADN, en particulier une thymidine-kinase et une DNA-polymerase. Il semble que ces synthèses enzymatiques soient dues à l'activation par le génome viral de gènes cellulaires qui étaient jusqu'alors réprimés, les cellules étant en monocouche subconfluente ou confluente au moment de l'infection. Ces systèmes enzymatiques permettent la replication de l'ADN cellulaire mais ce phénomène n'est pas suivi par une mitose. (VOGT et coll. 1966 *(262)*). L'antigène T nucléaire peut dès lors être mis en évidence par immunofluorescence. Puis la replication du DNA viral se produit. De grandes quantités d'ARN spécifique du virus sont synthétisées. Il s'agit d'ARN messager polycistronique.

Cet ARN est transféré dans le cytoplasme où il dirige la synthèse des protéines de la capside qui sont elles-mêmes ensuite transportées dans le noyau où a lieu le phénomène d'encapsidation. Le phénomène de maturation peut conduire soit à des particules pleines, contenant de l'ADN viral soit à des particules creuses soit à des particules contenant de l'ADN cellulaire. Aucune enzyme n'est impliquée dans le mécanisme de la maturation.

La cellule est alors lysée et libère des virions infectieux dans le milieu.

L'action lytique spécifique du virus polyome a donné lieu à deux méthodes de titrage. EDDY et coll (1958 *(83)*) ont utilisé le pouvoir cytopathogène direct tandis que DULBECCO et VOGT (1954 *(73)*) démontraient qu'il y avait proportionnalité entre le nombre de plages observées et la dilution du virus introduite dans le milieu. La spécifité biologique des plages a été démontrée par la production de tumeurs chez la souris et le hamster nouveaux-nés après inoculation du matériel d'une seule plage. D'autre part, la formation des plages est inhibée par action d'antisérums spécifiques du virus polyome (réaction de protection in vitro).

Enfin, cette technique des plages permet de distinguer deux souches de virus polyome : une souche donnant des plages de grandes dimensions (LP pour " large plaque ") et une souche donnant des plages de petites dimensions (SP pour " small plaque ") (MEDINA et SACHS 1963 *(171)*).

II - LE CYCLE TRANSFORMANT

1) - GENERALITES SUR LA TRANSFORMATION CELLULAIRE PAR LES VIRUS ONCOGENES

Avant d'aborder l'étude de l'action transformante du virus polyome, il nous paraît utile de rappeler la définition du phénomène de transformation cellulaire lui-même ainsi que ses principales caractéristiques et, tout particulièrement, les modifications apportées aux propriétés de surface des cellules transformées.

Tout d'abord, avec MONTAGNIER (1970 *(181)*), il nous faut d'emblée distinguer la transformation, qui est un phénomène cellulaire, de la cancérisation qui ne se conçoit qu'au niveau d'un organisme tout entier. Cette transformation comporte plusieurs degrés et ce n'est qu'après un certain degré que la multiplication non régulée des cellules transformées à l'intérieur d'un organisme vivant aboutit à une tumeur, donc à un cancer. Il faut donc reconnaître deux processus distincts :

– La production de la première cellule transformée

– Et la formation de la masse néoplasique.

Les interprétations concernant la transformation sont variées et souvent contradictoires. Nous nous bornerons à rapporter ici les conceptions de BLACK, exprimées dans une revue générale récente (1968) *(33 bis)* et qui nous paraissent résumer l'état actuel de la question.

La transformation elle-même se définit comme une modification héréditaire des propriétés de la cellule, consécutive à une action cancérigène en particulier virale et qui se manifeste globalement par une diminution des capacités de régulation du potentiel de croissance cellulaire. Elle peut s'effectuer par étapes, avec progression vers des stades évolutifs de plus en plus transformés.

Les cellules transformées présentent un certain nombre de caractéristiques qui les distinguent des cellules normales et qu'il convient d'énumérer maintenant (MACPHERSON 1963 *(160)*).

a) Modifications morphologiques

Ce sont les plus évidentes et les mieux connues ; elles se retrouvent aussi bien dans les cellules cancéreuses provenant de tumeurs que dans les cellules transformées in vitro. Ce sont essentiellement : une anisocaryose, une anisocytose, une hyperchromatophilie,une augmentation des rapports nucléo-cytoplasmiques et nucléolo-nucléaires associés à une répartition anormale de la chromatine, une irrégularité du noyau et un épaississement des membranes cellulaires.

b) Modifications métaboliques

L'activité métabolique est, en général, globalement augmentée par rapport à celle de la cellule normale. En particulier, l'activité glycolytique est élevée, tant en aérobiose qu'en anaérobiose, ce qui se traduit par une acidification rapide du milieu de culture (PAUL et coll 1966 *(200)*). La synthèse protéique est accrue, de même que l'activité lipolytique La synthèse des acides nucléiques, ADN et ARN, y est plus intense que dans la cellule normale. D'une façon générale, on constate une modification des processus de régulation métabolique.

c) Augmentation de la vitesse de multiplication par accélération du processus mitotique lui-même et diminution du temps de doublement. Les cellules transformées acquièrent de plus la propriété de pousser indéfiniment en culture et sont à l'origine de lignées cellulaires continues.

d) Anomalies cytogénétiques

Le simple passage en culture provoque chez les cellules un certain degré d'aneuploïdie (VOGT et DULBECCO 1963 *(261)*). On peut cependant observer des anomalies plus particulières en rapport avec la transformation : polyploïdie, délétions chromosomiques, polysomie. Ces modifications peuvent même être tellement importantes qu'elles conduisent à des anomalies mitotiques majeures aboutissant à la production de cellules polynuclées. Aucune anomalie, cependant, n'est spécifique du virus (HELLSTROM K. et coll. 1963 *(128)*).

e) Emergence de nouveaux composés antigéniques dont les uns sont directement en rapport avec le virus inducteur (antigènes de la capside) et dont les autres sont sous la dépendance du génome viral (antigène nucléaire T, antigène de surface S et antigène de rejet d'homogreffe TSTA). Ces néo-antigènes tumoraux sont viro-spécifiques et ont été étudiés dans un paragraphe précédent.

f) Résistance accrue aux conditions hostiles

Les cellules transformées sont capables de se multiplier dans des milieux pauvres en sérum (STANNERS et TILL 1963 *(233,234)*), à basse température (MEDINA et SACHS 1963 *(117)*) et même à haute température (OSSOVSKI et SACHS 1967 *(195)*). Elles deviennent de plus résistantes à un certain nombre de drogues : antibiotiques, benzopyrène. Cette capacité de résister à des conditions hostiles serait un des facteurs du développement des tumeurs et des métastases à l'intérieur des organismes (malgré l'infection, l'ischémie et les défense de l'hôte). Enfin, ces cellules sont capables de pousser en présence de molécules polysulfatées acides (MONTAGNIER 1970 *(181)*).

g) Modifications de la surface cellulaire

Ce sont certainement les plus importantes. Certains auteurs (SACHS 1965 *(218)*) on prétendu que les phénomènes de surface n'étaient pas seulement les témoins de la transformation mais étaient en fait à la base du phénomène lui-même. Cette notion doit, à notre avis, être considérée à la lumière des découvertes récentes de la Biologie Moléculaire en particulier en ce qui concerne l'enzymologie et la régulation de la synthèse de l'ADN. Ces expériences ont, en effet, mis en évidence en plus de l'ADN-polymerase de KORNBERG, une réplicase de l'ADN liée à la membrane dont le rôle semble absolument fondamental dans la régulation du phénomène mitotique (KNIPPERS et STRATLING ; OKASAKI et SIGIMOTO ; CAIRNS 1970).

La surface cellulaire n'est pas assimilable à la surface d'un corps solide ou liquide au sens physique du terme. Elle a été très étudiée au cours de ces dernières années (CURTIS 1967 ; WEISS 1969 ; MARTINEZ-PALOMO 1970 ; PETHICA et CAMBRAI 1970 ; POLICARD 1972 *(59, 268, 167, 204, 207)*) et sa structure est actuellement mieux connue. Elle correspond, en fait, à une formation complexe située à la région superficielle, périphérique de la cellule vivante. En microscopie électronique, elle mesure 0,5 à 1 micron d'épaisseur et apparaît constituée de trois zones formant un ensemble fonctionnel indissociable :

– A la périphérie, une zone de 50 à 100 Å, mal définie, de nature glycoprotéique, riche en mucopolysaccharides acides, marquant le contact entre la cellule elle-même et son micro environnement. Cette région toute superficielle, parfois appelée glycocalix est probablement la plus importante du point de vue physiologique.
C'est elle qui entre directement en contact avec les autres cellules au sein des tissus et avec le support sur lequel la cellule est placée. C'est certainement à ce niveau que doivent être recherchées les spécificités antigéniques et biochimiques nouvelles qui apparaissent au cours de la transformation.

– Au dessous, la membrane plasmique elle-même, mesurant de 75 à 100 Å d'épaisseur, lipoprotéique, se présentant sous la forme maintenant classique d'un feuillet clair entouré de deux feuillets opaques. La structure de cette membrane plasmique est encore imparfaitement connue. Son importance est cependant très grande. Elle contracte des rapports très étroits avec la partie supérieure dont elle ne doit pas être dissociée.

Elle se comporte comme une membrane à perméabilité sélective et règle étroitement les échanges de la cellule avec l'extérieur, en particulier l'entrée des métabolites régulateurs du fonctionnement cellulaire et de la mitose.

– Enfin, une région spéciale du cytoplasme, l'hyaloplasme périphérique, différant du cytoplasme général par sa pauvreté en organites, et en particulier par la rareté des mitochondries et de l'ergastoplasme à son niveau.

Ainsi considérée, la surface cellulaire normale constitue un tout fonctionnel harmonieux dont l'activité règle de façon très strictement équilibrée l'activité et le métabolisme cellulaires. Elle se caractérise par son asymétrie tant morphologique que fonctionnelle et par sa polarisation. Elle est remarquable par sa grande résistance mécanique et son élasticité. La tension superficielle y est très faible quand elle est plongée dans un liquide aqueux. De plus, elle porte une charge électrique le plus souvent négative. Cette charge électrique de la surface cellulaire est particulièrement importante à considérer : elle est dûe à la nature même des glucides constitutifs de la glycocalix (grande richesse en acide sialique) et au fait que l'adsorption des anions y est plus intense que celle des cations.

Les modifications entraînées au niveau de la surface par la transformation virale ont fait l'objet d'un nombre considérable de travaux (ABERCROMBIE et AMBROSE 1962 ; DEFENDI et GASIC 1963 ; VOGT 1963 ; WEISS 1967 ; MARTINEZ-PALOMO et coll. 1969 ; HAUSE et coll. 1970 ; SHEININ et coll. 1971 *(1,64,158,168,127,226)*). Nous rapporterons ici les principaux résultats.

Les anomalies de la surface sont d'ordre histochimique, antigénique et dynamique.

Sur le plan histochimique il faut noter la modification tant qualitative que quantitative des mucopolysaccharides de la glycocalix. L'augmentation de ces substances peut être directement visualisée par la réaction de HALE et, en microscope électronique, par une technique utilisant le rouge de ruthénium (MARTINEZ-PALOMO et BRAILOVSKY 1968 ; BONNEAU et CESARINI 1968 et CESARINI et BONNEAU 1968 *(168, 36, 46)*). L'épaisseur de la couche dense fixant le colorant est de l'ordre de 130 Å pour l'embryon de hamster, de 160 Å pour la cellule BHK 21/C13 et de 240 Å pour la BHK 21 transformée par le virus polyome. Un traitement par la neuraminidase diminue l'intensité de la réaction. Sur le plan qualitatif, d'autre part, les modifications des glucides de surface (et en particulier de l'acide neuraminique et de l'acide sialique) se traduisent par une modification de charge électrique de la cellule (MAC PHERSON 1963 *(160)*) et par des anomalies de la migration électrophorétique (FORRESTER 1962 et 1964 *(88, 89)*).

Le point de vue immunologique, c'est-à-dire l'apparition des néo-antigènes de surface, a été envisagé dans un autre paragraphe.

Sur le plan dynamique, les anomalies sont nombreuses et peuvent être mises en évidence par des méthodes variées.

Alors que les cellules normales, en culture, se développent d'une façon harmonieuse en une monocouche fine et régulièrement disposée (travées parallèles de cellules), les cellules transformées, au contraire ont une croissance anarchique, en amas irréguliers et polystratifiés, avec de nombreux chevauchements et croisements. Cette

croissance irrégulière et tridimensionnelle peut même conduire à la formation de colonies pluricellulaires. Cette propriété particulière doit être attribuée à la perte de l'inhibition de contact. La topo-inhibition ou inhibition de contact est caractérisée, dans les cultures cellulaires normales, par un arrêt des mitoses en phase G1 quand les cellules viennent à se toucher. Il s'agit d'une propriété liée directement à la surface cellulaire et qui est perdue par les clones transformés. Cela conduit à une augmentation de la densité de saturation qui passe de 1 à 5 x 10^4 cellules par cm2 en moyenne pour les cellules normales à 10 à 50 x 10^4 cellules par cm2 pour les cellules transformées.

De plus, les cellules transformées ne nécessitent pas de support solide (ancrage) pour leur développement et peuvent croître en suspension en milieu liquide. Cela a permis à MONTAGNIER et MAC PHERSON (1964 *(182)*), et à MAC PHERSON et MONTAGNIER (1964 *(161)*) travaillant sur la souche BHK 21 transformée par le virus polyome de mettre au point un test de croissance sélective en gélose utilisable pour déterminer le degré de transformation d'une souche (rendement en colonies en gelose semi-molle) ou la proportion de cellules transformées dans une population cellulaire donnée.

Les cellules transformées ont une mobilité plus grande que les cellules normales et cette propriété doit probalement être rapprochée de la formation de métastases. Par contre, l'activité phagocytaire disparaît dans les souches transformées.

Enfin, les cellules transformées acquièrent la capacité de former des agglutinats en présence de lectines.

h) Acquisition de la tumorigénicité in vivo

Il s'agit du test final de la transformation maligne. Les cellules transformées acquièrent la possibilité de former des tumeurs chez l'animal par transplantation syngénique (STOKER 1962 *(242)*). La quantité de cellules nécessaires pour provoquer une tumeur chez l'animal receveur (DT 50) est inversement proportionnelle à la tumorigénicité et constitue le critère essentiel de la transformation.

2) - LA TRANSFORMATION PAR LE VIRUS POLYOME

Quand il est placé au contact de cellules dites non permissives, telles que les cellules de hamster (SACHS et MEDINA 1961 ; STOKER et MAC PHERSON 1961 ; STOKER et ABEL 1962 *(219, 245, 244)*), de rat (WILLIAMS et TILL 1964 *(272)*) voire de bœuf (THOMAS et LEBOUVIER 1967 *(254)*) le virus polyome ne provoque pas d'effet cytopathogène, mais transforme de façon stable et définitive un certain pourcentage de ces cellules qui acquièrent alors les propriétés que nous venons de décrire. Une multiplicité d'infection très grande, de l'ordre de 10^2 à 10^4 particules infectieuses par cellule est exigée pour initier un cycle transformant (STOKER et ABEL 1962 ; MAC PHERSON et MONTAGNIER 1964 ; TODARO et GREEN 1966 *(244, 161, 259)*).

Un des problèmes essentiels posés par la transformation est celui de l'intégration du génome viral au génome cellulaire. En effet, après transformation, on ne peut déceler, en règle, aucune particule virale : il semble que le virus pénètre dans la cellule puis disparaisse. Ce phénomène conduit d'emblée à se demander si le génome du polyome est présent, intégré peut-être à l'un des chromosomes de l'hôte par suite d'un phénomène de crossing-over entre l'ADN circulaire du virus et l'un des chromosomes de la cellule. Il serait alors tentant de tracer un parallèle avec ce qui se passe pour les bactériophages tempérés infectant une bactérie lysogène. Les phages ont en effet deux destins possibles. Ils peuvent se multiplier en provoquant la lyse ou bien s'intégrer au chromosome de la bactérie hôte par un phénomène de crossing-over. Cette intégration est possible grâce à la présence d'un represseur de la multiplication du phage. Leur attachement au chromosome n'est cependant pas irréversible. Dans certaines conditions, le phage intégré quitte le génome cellulaire et produit de nouvelles générations de particules.

Une protéine à activité inhibitrice sur la multiplication du virus, appelée represseur, semble exister dans la cellule transformée par le virus polyome (CRAMER et coll *(52)* ; MEYER et coll *(174)*). Son existence permettrait de rapprocher encore le phénomène de la transformation du phénomène de la lysogènie.

Disons d'emblée que, en ce qui concerne le virus polyome (et cela n'est pas toujours vrai pour d'autres virus oncogènes à ADN, en particulier pour le virus SV40), aucun procédé d' " induction " (par la mitomycine, par les radiations UV ou X) n'a réussi à faire démarrer un cycle lytique avec production de particules infectieuses, chez une cellule transformée.

De même, toujours en ce qui concerne strictement le virus polyome, les essais d'hybridation d'acides nucléiques semblent n'avoir pas été convaincants (DULBECCO ; WEIL). Cependant, l'existence d'un cycle transformant productif (FOGEL et SACHS 1969 et 1970 *(86, 87)*), la production de petites quantités de particules virales par des hybrides souris-hamster après surinfection par un virus différent du virus transformant (BASILICO 1971 *(19)*) et la persistance de néoantigènes tumoraux tant nucléaires que de surface, viro-spécifiques, dans les cellules transformées paraissent constituer de bons arguments en faveur d'une intégration du génome viral au génome cellulaire.

L'intégration d'une partie ou de la totalité du génome viral dans le génome de l'hôte semble donc très probable.

L'ADN viral a été retrouvé dans le tissu transformé, et des ARN spécifiques du virus ont été détectés par des techniques d'hybridation ADN-ARN dans des cellules transformées pour lesquelles il n'a pas été possible de mettre en évidence de virus libres. (BENJAMIN 1966 ; REICH et coll 1966 ; FUJINAGA et GREEN 1966 *(26, 95, 96)*). Lorsque l'on compare les ARN spécifiques du virus produits dans des cellules infectées et dans des cellules transformées, il semble que seuls les ARN précoces soient produits dans ces dernières (SHEININ 1966 *(225)*). On sait que certaines parties du génome viral sont

intensément transcrites (et probablement traduites) dans le tissu transformé, ce qui laisse supposer qu'elles jouent un rôle déterminant dans les modifications métaboliques liées à la transformation.

L'oncogénicité du virus polyome a été reliée à sa composition nucléotidique. Par analogie avec l'homologie des séquences des bases des ADN de Escherichia coli et du phage λ, et de l'intégration de l'ADN phagique au génome bactérien (COWIE 1963 *(51)*), de nombreux auteurs ont recherché un fait analogue pour les virus oncogènes. Le phénomène fondamental qui rend compte de la recombinaison génétique est l'homologie séquentielle entre l'ADN exogène considéré comme donneur et l'ADN de la cellule réceptrice. De fait, la composition en guanine-cytosine du virus polyome (47 °/o) est très voisine de la composition en bases de l'ADN des mammifères (42 °/o). Par hybridation, des homologies de séquences ont été démontrées entre l'ADN de la souris et celui du virus polyome, entre l'ARN de la souris et celui du virus polyome. WINOCOUR (1967 *(274)*) a proposé que l'homologie entre les ADN viraux et l'ADN de l'hôte provienne de fragments d'ADN de l'hôte encapsidés dans des virions au cours des passages précédents dans une cellule hôte. Les unités 14 S, non infectieuses, appelées pseudo-virions par divers auteurs (MICHEL et coll 1967 *(180)*) seraient excisées au hasard dans le génome de la souris et ne proviendraient pas d'une espèce mineure d'ADN de l'hôte repliquée massivement au cours d'un processus analogue à l'amplification séquentielle. En utilisant le composant circulaire 10 S du polyome, aucune homologie ne fut observée avec l'ADN de la souris. On peut se demander comment ces séquences homologues interviennent dans le mécanisme de la transformation. Prennent-elles la place de séquences homologues pré-existantes dans l'hôte en introduisant une information spécifique du virus qui serait alors responsable des caractéristiques de l'état transformé ?

La nécessité d'une synthèse d'ADN cellulaire, provoquée par le virus, a été démontrée. Cette stimulation de la synthèse d'ADN chez l'hôte, s'effectue par un mécanisme qui reste encore obscur (probablement une derepression de gènes dont l'expression est inhibée dans la cellule normale en inhibition de contact). Elle est cependant bien dûe à l'action du génome viral lui-même puisque les capsides vides et les virus inactivés par les radiations ne l'induisent pas. L'activation du complexe synthètisant l'ADN cellulaire provoque une période S au cours de laquelle le génome viral est intégré au génome cellulaire.

Le nombre de génomes viraux intégrés au génome cellulaire et le site exact de cette intégration ne sont pas connus avec précision. On sait qu'une partie au moins d'un génome viral doit être fixée de manière stable, mais certains auteurs (WINOCOUR 1967 *(274)*) prétendent qu'un grand nombre d'équivalents viraux (jusqu'à 20) sont présents dans chaque cellule transformée. On ne sait si l'intégration se fait au hasard ou au niveau de sites chromosomiques particuliers.

En résumé, on peut dire, que quand il est mis en présence de cellules non permissives, le virus polyome entreprend un cycle transformant au cours duquel aucun

effet lytique n'est observé mais où, à l'occasion d'une replication de l'ADN cellulaire initiée par lui, un ou plusieurs génomes viraux s'intègrent au génome cellulaire et transforment la cellule de façon stable et héréditaire, cette transformation se traduisant par un certain nombre de propriétés nouvelles acquises par la cellule, et en particulier de propriétés histochimiques et antigéniques de surface.

III - LE CYCLE ABORTIF

Quand on infecte des cellules BHK 21 de hamster ou des cellules de rat par du virus polyome à haute multiplicité d'infection (10^2 à 10^3 UFP par cellules), on observe une pénétration du virus dans la quasi totalité des cellules, et quelques virions se répliquent dans une très faible minorité de cellules (environ 1 °/o).

Après les 4 à 8 premières divisions cellulaires, ces cellules ainsi infectées aboutissent à deux types de clones :

– Un clone qui achèvera une transformation complète (1 à 5 °/o des cellules BHK 21 ; 5 °/o des cellules de rat) et qui possèderont dès lors de façon stable les caractères décrits précèdemment.

– Un clone, comprenant la grande majorité des cellules, qui perdra les caractères transformés transitoirement acquis et reviendra à la normale.

C'est ce dernier phénomène observé par SACHS et MEDINA (1961 *(219)*), MEDINA et SACHS (1963 *(171)*), SHEININ (1966 *(225)*) et STOKER (1968 *(243)*) qui a été dénommé " transformation abortive " ou " infection abortive ". Sa description varie d'un auteur à l'autre, et avec les méthodes utilisées pour l'étude de ce phénomène.

D'une manière synthétique, on peut dire qu'au cours de ce cycle abortif, la cellule infectée acquiert pendant une période de temps limitée les caractères phénotypiques de la transformation, et à ce moment, elle se comporte comme une cellule transformée, puis qu'elle " guérit " et qu'elle retrouve un aspect et un comportement normal.

On peut en effet observer au niveau de la cellule BHK 21 infectée par le virus polyome :

– Une synthèse de DNA cellulaire induite par le virus suivie d'une vague de mitoses dans la culture infectée (débutant à la 28me heure après l'infection, maximum à la 36-40me heure).

– L'apparition d'un antigène nucléaire T, maximum à la 6me heure après l'infection et qui disparaît à partir de la 48me heure (MEYER et coll 1967 *(176)*).

– L'apparition d'un antigène de surface S, apparaissant à la 12me heure, maximum à la 18me heure et disparaissant à la 72me heure (MEYER et BIRG 1969).

– Une morphologie caractéristique de la culture, qui a perdu l'inhibition de contact, (DEFENDI et LEHMAN 1965 *(65)*) et qui présente des mouvements anormaux (polyspeudopodes). Ces caractéristiques disparaissent au bout de 5 à 7 jours de culture.

– La possibilité de pousser en milieu liquide et de donner des colonies en méthyl-cellulose (STOKER).

– Des modifications de l'agglutinabilité cellulaire par les lectines, qui feront l'objet de la partie expérimentale de ce travail et seront discutées à ce moment.

On sait que ce phénomène n'est pas dû à un défaut de pénétration du virus dans la cellule puisque l'infection a lieu de façon normale.

La question reste posée de savoir pourquoi certaines cellules subissent une transformation complète et d'autres reviennent à la normale. On ne sait pas non plus s'il s'agit là d'une propriété particulière du virus polyome ou du système cellulaire sur lequel il est placé.

METHODES DE PRODUCTION ET DE TITRAGE DU VIRUS POLYOME

– PRODUCTION DU VIRUS SUR CELLULES DE SOURIS

– TITRAGE DU VIRUS PAR LA METHODE DES PLAGES

– TITRAGE DU VIRUS PAR LA METHODE D'HEMAGGLUTINATION

– ETUDE DU POUVOIR TRANSFORMANT IN VITRO

A - INTRODUCTION

Nous nous proposons de rapporter dans ce chapitre, d'une manière très brève, les méthodes qui sont utilisées pour produire le virus polyome et pour titrer les préparations virales obtenues.

La production du virus est effectuée selon la technique de CRAWFORD, *(53)* modifiée par BOURGAUX. Elle se fait sur cellules de souris et conduit à des titres relativement élevés.

Le titrage lui-même est effectué :

– Par la méthode des plages de DULBECCO et VOGT. *(73)*. Cette méthode ne teste que les particules virales infectieuses. L'unité est l'UFP (Unité Formant Plage). Il s'agit d'une méthode simple, relativement fidèle et sensible ; finalement assez précise.

– Par la méthode d'hémagglutination de globules rouges de cobaye, décrite par EDDY *(79, 80)*. L'unité hémagglutinante est l'inverse de la dernière dilution du virus donnant encore une hémagglutination visible. On a déjà noté l'absence de parallèlisme entre l'unité hémagglutinante et l'unité infectieuse.

Enfin, le pouvoir transformant du virus peut être titré par la mesure du rendement en colonies en gélose, selon la technique mise au point par MAC PHERSON et MONTAGNIER. *(161)*.

B - PRODUCTION DU VIRUS POLYOME

Le milieu de base utilisé pour la culture est le milieu de EAGLE complet dont la composition en sels minéraux, acides aminés et vitamines est bien connue (1959 *(75)*). Ce milieu est en général complémenté par addition de 10 °/o de sérum de veau, 10 °/o de tryptose et adjonction de pénicilline (1 million d'unités internationales) et de streptomycine (1 gramme). L'indicateur de pH est le rouge neutre. On obtient ainsi le milieu final dit ETC (EAGLE-Tryptose-Sérum de veau).

Sur une monocouche d'une première subculture de cellules d'embryon de souris, on ajoute une dilution de virus polyome contenant 10 UFP par cellule. Le contact est maintenu pendant 1 heure puis on ajoute aux boîtes de culture du milieu ETC, en quantité proportionnelle au volume du flacon. Les cultures infectées sont placées à l'étuve à 37 ° C pendant 5 à 7 jours. Elles sont surveillées chaque jour.

Avant la lyse cellulaire, les cellules sont décollées du verre à l'aide d'un morceau de caoutchouc monté sur une baguette de verre (" Rubber-Policeman ").

La préparation est transférée dans des tubes à centrifuger, refroidie à + 4° C et centrifugée à 5000 g pendant 20 minutes à basse température. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire suspendu dans une petite quantité de tampon phosphate de type PBS (phosphate buffered saline 0,15 M de NaCl pH 7,4). On lui fait subir 3 congélations et décongélations rapides puis la suspension cellulaire est soumise à 2 séries de vibrations ultrasoniques (fréquence : 3×10^4 hertz) de 15 minutes chacune. On assure une homogénéisation parfaite.

On ajoute à la suspension 20 °/o de neuraminidase qu'on laisse agir 18 heures à 37° C.

Puis le pH est ramené à 8,0 par adjonction de bicarbonate de sodium et la préparation est centrifugée à 5000 g pendant 20 minutes.

Le surnageant constitue la préparation de virus. Elle peut être purifiée par les méthodes classiques de purification (ultra centrifugation sur gradient par exemple).

C - TITRAGE DU VIRUS PAR LA METHODE DES PLAGES

Des cellules d'embryons de souris de 19 à 20 jours sont mises en culture. La première subculture est effectuée en boîtes de Petri en plastique de 60 mm. de diamètre (type FALCON). En 24 à 48 heures, on obtient une monocouche régulière de fibroblastes.

Les différentes dilutions de la préparation virale à titrer sont effectuées en milieu de EAGLE complet additionné de 2,5 °/o de sérum de poulain.

Le milieu de culture de chaque boîte est éliminé, et remplacé par 0,2 ml. de la dilution virale à tester, déposé au centre de la monocouche et étalé de façon régulière.

Le contact est maintenu pendant 1 heures à 37° C en atmosphère de CO_2. Puis on ajoute dans chaque boîte un milieu gélosé à 0,9 °/o (milieu de EAGLE + sérum de veau 5 °/o + Agar Noble Difco) maintenu à 44° C. La préparation se gélifie en refroidissant.

L'incubation se poursuit pendant 3 jours à 37°C en atmosphère de CO_2 puis on ajoute à nouveau 3 ml. de milieu gélosé à 0,9 °/o. Huit jours après, est ajoutée une troisième couche de milieu gélosé à 0,9 °/o contenant de plus de 2,5 °/o de sérum de poulain et du rouge neutre à 0,4 °/o.

L'observation des plages se fait les 9me, 10me et 11me jours après l'infection par le virus. La taille des plages est en moyenne d'un demi-millimètre pour les souches SP (Small plaque) et de 2 à 3 millimètres pour les souches LP (large plaque). Les résultats sont exprimés en nombre d'UFP (unités formatrices de plages) par millilitre.

D - TITRAGE DU VIRUS PAR LA METHODE D'HEMAGGLUTINATION

Les globules rouges utilisés proviennent du cobaye. Ils sont prélevés chez l'animal par ponction cardiaque et lavés 3 fois en tampon phosphate pH 7,2. Ils peuvent être conservés à + 4°C pendant 3 à 4 jours. Ils sont utilisés en suspension à 0,75 °/o en tampon phosphate.

Le titrage peut se faire par la méthode classique en tube ou par une microméthode sur plaques. Dans la première méthode, le virus est suspendu dans du tampon phosphate et réparti sur un volume de 0,2 ml. par tube. Les globules rouges sont également répartis à raison de 0,2 ml. par tube.

Après agitation, la réaction se fait à + 4° C pendant 2 heures.

Le titre du virus est l'inverse de la plus grande dilution ayant provoqué une hémagglutination complète.

Il faut noter qu'un antisérum contenant des anticorps dirigés contre le virus est capable d'inhiber la réaction d'hémagglutination et cette propriété est à la base d'une réaction de titrage des antisérums.

E - ETUDE DU POUVOIR TRANSFORMANT IN VITRO

On a vu que la transformation des cellules de la lignée BHK 21/C13 par le virus polyome leur confère la propriété de former des colonies dans un milieu gélifié par de la gélose. Un test hautement sensible du pouvoir transformant du virus peut être basé sur cette propriété. (MONTAGNIER et MAC PHERSON 1964 *(182)*).

Les cellules BHK 21 sont d'abord cultivées en milieu ETC ; elles sont dispersées par trypsination et comptées. La concentration cellulaire est ajustée à 10^6 cellules par ml. Le virus à tester titre 2×10^{10} UFP par ml. sur cellules de souris. L'infection des cellules a lieu en suspension à 37° pendant 1 heure.

Les cellules sont ensuite lavées deux fois en milieu ETC et resuspendues dans le même milieu à la concentration requise.

Une couche-support de gélose à 0,33°/o est coulée dans des boîtes de Petri de 60 mm. à raison de 7 ml. par boîte. Dès que cette couche est solidifiée, on verse dessus un mélange de 1 ml. de milieu gélosé à 0,5 °/o à 44° C et de 0,5 ml. de suspension cellulaire à la température ordinaire. Le nombre de cellules est de l'ordre de 5×10^5 cellules par boîte.

L'incubation a lieu à 37° C, en atmosphère humidifiée et en 5 °/o de CO_2. Les colonies sont comptées 8 à 10 jours après, à l'œil nu. Elles mesurent environ 0,5 mm. de diamètre. Le nombre de colonies formées après infection dépend du pouvoir transformant du virus et est une fonction linéaire de la multiplicité d'infection utilisée.

LES METHODES DE QUANTIFICATION DE L'ACTION DE LA CONCANAVALINE A

A – LES DIFFERENTES METHODES D'ETUDE

B – LA METHODE PROPOSEE

A – LES DIFFERENTES METHODES D'ETUDE

I DESCRIPTION

1o – METHODES NE FAISANT PAS DIRECTEMENT APPEL A UNE REACTION D'AGGLUTINATION

a) Techniques utilisant la Concanavaline A marquée radioactivement,

b) Techniques utilisant la Concanavaline A marquée par une substance opaque aux électrons,

c) Tests de consommation de la Concanavaline A,

d) Test d'inhibition de la mobilité des cellules tumorales.

2) - METHODES FAISANT DIRECTEMENT APPEL A UNE REACTION D'AGGLUTINATION

a) Méthodes indirectes,

b) Méthodes directes.

II CRITIQUE DES METHODES PRECEDENTES

1o – LES METHODES UTILISANT LA CONCANAVALINE A MARQUEE

2o – LES TESTS DE CONSOMMATION

3o – LE TEST D'INHIBITION DE LA MOBILITE CELLULAIRE

4o – LES METHODES AUTOMATISEES

5o – LES METHODES D'AGGLUTINATION CLASSIQUES

A - LES DIFFERENTES METHODES D'ETUDE

I DESCRIPTION

1) - METHODES NE FAISANT PAS DIRECTEMENT APPEL A UNE REACTION D'AGGLUTINATION

Plusieurs méthodes ont été proposées pour essayer de préciser le nombre de sites de fixation de la Concanavaline A au niveau de la surface des cellules transformées. Pour leurs auteurs, la connaissance du nombre de sites superficiels fixant la Concanavaline A devait apporter des indications sur le caractère de la souche cellulaire étudiée, et éventuellement sur son degré de transformation.

Nous pouvons distinguer essentiellement deux types de méthodes :

– Les techniques utilisant la Concanavaline A marquée soit par un atome radioactif soit par une substance opaque aux électrons.

– Et celles faisant appel à un test de consommation de la Concanavaline A.

a) Techniques utilisant la Concanavaline A marquée radioactivement

Nous avons passé en revue dans un chapitre précédent les différents procédés de marquage de la Concanavaline A par des substances radioactives (Ni^{63}, I^{125}, H^3).

Les cellules à étudier sont mises en présence de Concanavaline marquée jusquà ce que la fixation soit complète (30 minutes environ) et la détermination du nombre de molécules de Concanavaline A fixées, donc du nombre de sites de surface, se réduit à un comptage de radioactivité.

Connaissant la radioactivité spécifique du produit employé et son poids moléculaire, la densité des sites est calculée ensuite en faisant le rapport du nombre de molécules fixées sur chaque cellule sur la valeur de la surface cellulaire. Le résultat s'exprime en nombre de sites par micron-carré de surface cellulaire.

b) Techniques utilisant la Concanavaline A marquée par une substance opaque aux électrons.

Les techniques de marquage par les substances visibles en microscopie électronique (Ferritine, Péroxydase, métal lourd de type mercure) ont été étudiées dans un chapitre précédent.

Les molécules marquées deviennent, grâce à ces méthodes, directement visibles, sous forme de points ou d'amas foncés et permettent un comptage direct des sites de surface qui se ramène à un dénombrement de points en microscopie électronique.

Il faut rapprocher de ces techniques le couplage des lectines avec une substance fluorescente, type fluorescéine, qui permet une appréciation grossière de la fixation, proportionnelle à l'intensité de la fluorescence, côtée en croix, au moyen du microscope optique.

c) Les tests de consommation de la Concanavaline A

Les tests de consommation (ou tests en retour) sont très utilisés en Biologie, tant en Hématologie (test de consommation de l'Héparine) qu'en Immunologie (déviation du Complément).

Nous rappelons que ce type de tests consiste à faire consommer dans un premier temps une quantité connue d'une substance donnée par le système à étudier puis, dans un second temps, à tester l'activité résiduelle de la substance au moyen d'un système connu et étalonné. L'importance de l'activité résiduelle lors du temps de révélation est inversement proportionnelle à la quantité consommée dans le premier temps. Le test peut répondre par tout ou rien, comme c'est le cas de la réaction de KOLMER, ou être rendu plus quantitatif de façon à apprécier de façon précise la quantité consommée.

Nous avons mis au point un test de consommation de la Concanavaline A dont la technique est la suivante (BARRA et coll. 1972 *(17)*).

Une quantité fixe de Concanavaline A est mise en présence de quantités croissantes de cellules sous un volume de 1 ml. Les doses doivent être déterminées par une série d'expériences préliminaires ; elles sont de l'ordre de 25 μg de Concanavaline A et de 2 x 10^6 à 50 x 10^6 cellules. Le test a lieu sous agitation continue, pendant une heure, à la température du laboratoire. Après centrifugation à 700 g pendant 5 mn, le surnageant est éprouvé selon la technique d'agglutination qui sera décrite ultérieurement.

En portant en ordonnée l'importance de l'activité agglutinante résiduelle et en abscisse la quantité de cellules ayant consommé la Concanavaline A dans un premier temps de l'expérience, on constate que le stade est d'abord en plateau à sa valeur maximale, puis qu'il décroît de manière linéaire et qu'enfin il s'annule pour une quantité de cellules donnée (Figure N° 3). On peut en conclure que cette quantité de cellules a fixé complètement la Concanavaline A avec laquelle elle a été en contact.

Connaissant le poids moléculaire de la Concanavaline A au pH où elle est utilisée, il est facile de calculer le nombre de molécules vraies donc de sites de fixation présents sur chaque cellule.

TEST DE CONSOMMATION DE LA CONCANAVALINE A

La quantité de Concanavaline A est fixe (25 μg)

En abscisse : la quantité de cellules ayant consommé la Concanavaline A lors de la première partie du test

En ordonnée : le stade d'agglutination atteint avec le surnageant.

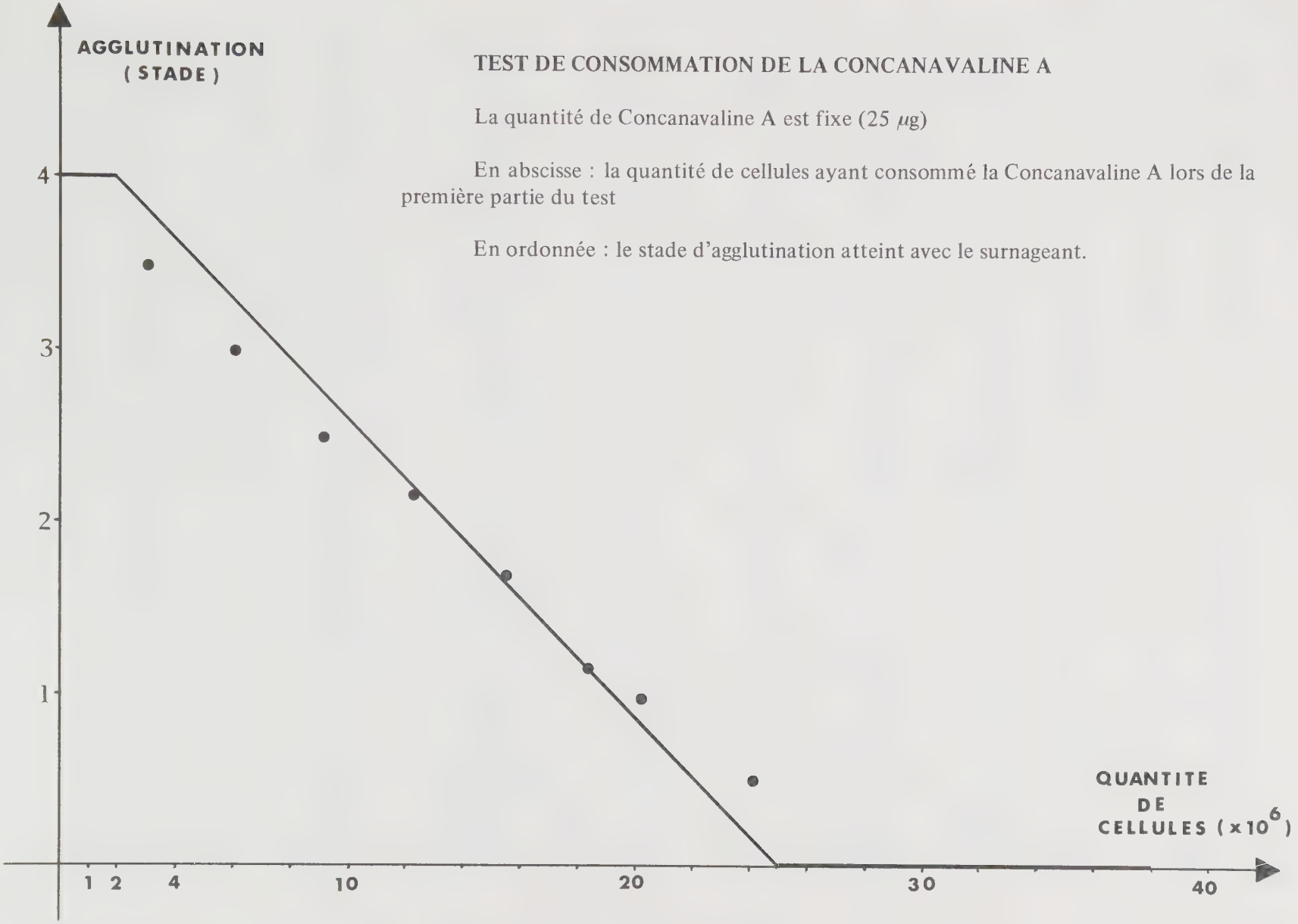


FIGURE n° 3

La densité des sites s'obtient en divisant le nombre total de sites par la surface et s'exprime en nombre de sites par micron-carré.

d) Le test d'inhibition de la mobilité des cellules tumorales

FRIBERG et coll. (1971 *(91)*) utilisent une méthode d'évaluation originale de la réactivité des cellules tumorales par inhibition de la migration cellulaire.

Il s'agit d'une méthode semi-quantitative inspirée du test d'inhibition de la mobilité des macrophages (GEORGE ET VAUGHAN 1962 *(97)*) et adaptée à l'étude de la mobilité des cellules tumorales par COCHRAN (1971 *(50)*).

Les cellules tumorales en culture dans un milieu convenable et placées au fond d'un tube capillaire en verre tendent à migrer en dehors du tube et à occuper une surface déterminée dépendant des conditions de culture, de leur mobilité propre et proportionnelle au temps de migration.

L'adjonction de doses sub-agglutinantes de Concanavaline A au milieu entraîne, toutes choses étant égales par ailleurs, une diminution de la migration des cellules se traduisant par une diminution de la surface occupée à l'extérieur du tube.

Les auteurs définissent un indice de migration, rapport entre la surface couverte par les cellules traitées par la Concanavaline A et celle occupée pendant le même temps (en général 24 heures) par les cellules témoins. Ils montrent que cet indice est inversement proportionnel à la quantité de Concanavaline A ajoutée dans la culture (entre 1 et 50 μ g/ml).

Pour une concentration en Concanavaline A donnée, l'indice varie proportionnellement à la quantité minima de Concanavaline A nécessaire pour obtenir une agglutination, c'est-à-dire qu'il est d'autant plus petit que la souche cellulaire est plus transformée.

Toutes ces techniques donnent des résultats quantitatifs facilement interprétables. Cependant, il est maintenant établi que la fixation de la Concanavaline A et l'agglutination sont deux phénomènes différents, et la propriété fondamentale reste, en fait, une agglutination cellulaire d'où le grand nombre de méthodes faisant appel à ce phénomène.

2) - METHODES FAISANT DIRECTEMENT APPEL A UNE REACTION D'AGGLUTINATION

Le facteur étudié ici est l'importance de l'agglutination provoquée, en un temps donné, par l'adjonction d'une quantité donnée de Concanavaline A à une suspension cellulaire homogène.

Cette réaction peut être étudiée par des méthodes indirectes et par des méthodes directes.

a) Méthodes indirectes

Ces méthodes nécessitent toutes un appareillage destiné à mesurer et à chiffrer l'importance de l'agglutination cellulaire.

O'NEILL et STOKER (communication personnelle) utilisent un compteur électronique de particules (" COULTER COUNTER ") mesurant directement la diminution du nombre de particules libres au fur et à mesure que la réaction d'agglutination progresse.

Ils calculent alors le temps, ou la quantité de Concanavaline A, nécessaire pour diviser par deux le nombre de cellules libres dans la préparation. Cette valeur serait caractéristique de chaque souche.

Nous avons nous même utilisé, sans succès, un appareil de ce type (SMA4) et une mesure de l'augmentation de turbidité d'une suspension cellulaire sous l'effet de la Concanavaline A au moyen d'un spectrophotomètre.

b) Méthodes directes

SUMMER et HOWELL (1936 *(249)*), les premiers, décrivent une méthode d'agglutination des hématies de mouton par la Concanavaline A.

Les hématies, lavées 3 fois dans une solution physiologique sont mises en suspension à 2,5 °/o dans une solution de NaCl à 0,85 °/o. A une batterie de tubes contenant chacun 1 ml de cette suspension sont ajoutées des dilutions croissantes de Concanavaline A et le mélange est laissé au repos à la température de la pièce. La lecture est effectuée au bout d'un temps variable et la réponse est du type tout ou rien : il y a ou il n'y a pas agglutination.

Cette méthode, inspirée des méthodes sérologiques, a été et est encore très utilisée pour tester l'activité d'une solution inconnue de Concanavaline A.

BURGER et GOLDBERG (1967) reprennent la technique de AUB et coll. (1963 *(13)*) utilisée pour l'agglutinine du germe de blé.

Une petite quantité (0,2 ml) de suspension cellulaire contenant 5 x 10^6 cellules par ml est mélangée à 0,02 ml de solution de lectine à concentration fixe.

Une goutte de la préparation est prélevée, après agitation, et observée au microscope.

L'agglutination est lue 5 minutes après addition de l'agglutinine. Elle est estimée selon une échelle en croix de type sérologique (de 0 à ++++).

POLLACK et BURGER (1969 *(208)*) utilisent 0,2 ml de suspension cellulaire à 5×10^6 cellules par ml qu'ils mélangent à 0,2 ml de solution d'agglutinine, à concentration décroissante (de 1 mg par ml à 3 μg par ml). L'agglutination est côtée en croix et ils notent quelle est la concentration minimale capable de provoquer une agglutination cellulaire notable au bout de 15 minutes.

La technique d'INBAR et coll. (1969 *(135)*) et d'INBAR et SACHS (1969 *(136, 137)*) a été reprise par de nombreuses équipes (BEN BASSAT et coll. 1971 *(25)*) et est actuellement très utilisée.

Les cellules à tester sont détachées du flacon de culture par action de l'EDTA. Après lavage, la concentration de la suspension cellulaire est ajustée à 1 ou 3×10^6 cellules par ml. La Concanavaline A est employée à la concentration finale de 100 à 500 μg par ml. Le mélange est effectué dans des boîtes de PETRI de 35 mm de diamètre en ajoutant 0,5 ml de suspension cellulaire à 0,5 ml de solution de lectine et incubé à la température du laboratoire. L'agglutination est lue au bout de 30 minutes et le nombre et la taille des agglutinats sont appréciés au moyen d'une échelle allant de – à ++++ .

II CRITIQUE DES METHODES PRECEDENTES

1) - METHODES UTILISANT LA CONCANAVALINE A MARQUEE

Les diverses méthodes utilisant la Concanavaline A marquée nécessitent un appareillage particulier et ne peuvent être mises en œuvre partout.

Rares, en effet, sont les laboratoires qui peuvent disposer de façon permanente de radio-isotopes et d'appareils destinés à la mesure de la radio-activité ou d'un microscope électronique.

Il s'agit de méthodes coûteuses, souvent délicates à mettre en œuvre, et parfois dangereuses à utiliser couramment. Elles nécessitent en tout cas une grosse infrastructure technologique et un personnel spécialisé.

Cependant, il s'agit de méthodes précises, en particulier celles utilisant les isotopes radioactifs, permettant de connaître avec une bonne approximation le nombre réel de molécules de Concanavaline A fixées sur un lot cellulaire de concentration connue. La précision est surtout limitée par l'erreur commise sur l'appréciation de la quantité de cellules mises en expérience et sur la taille de ces cellules. L'erreur liée à la mesure de la radioactivité spécifique et à la mesure de la radioactivité globale paraît nettement négligeable.

De plus, la réponse est donnée d'une manière chiffrée ce qui élimine de façon presque complète la subjectivité dans l'appréciation du résultat. Enfin, les méthodes utilisant la microscopie électronique laissent des documents photographiques faciles à étudier et qu'on peut conserver.

2) - LES TESTS DE CONSOMMATION

Ce type de test, comme les tests d'agglutination, présente le très grand avantage de ne nécessiter aucun matériel lourd et d'être d'une mise en œuvre très simple et facile.

Leur inconvénient majeur, relevé par de nombreux auteurs avant nous, est d'utiliser de très grosses quantités de cellules, de l'ordre de 200 à 500 x 10^6 cellules par test. Cette énorme consommation de cellules en culture exige une production en masse, ce qui pose toujours de très gros problèmes techniques. La mise au point d'une microméthode devrait permettre de réduire le caractère prohibitif de cette technique, par ailleurs très utile.

La précision des résultats est limitée, comme pour toutes les méthodes nécessitant la détermination de la surface cellulaire, par un certain nombre de facteurs. :

– La quantité de Concanavaline A utilisée peut être mesurée avec précision et n'introduit qu'une erreur négligeable,

– Le diamètre cellulaire moyen est mesuré soit par des procédés photographiques soit par des procédés électroniques. L'erreur commise sur cette mesure nous paraît relativement élevée ; elle dépend du degré d'anisocytose de la souche cellulaire étudiée. De plus, l'erreur relative sur la surface est deux fois plus importante que l'erreur sur le diamètre compte tenu du procédé de calcul.

– La précision sur la quantité de cellules utilisée est limitée par la précision de la cellule hématimétrique avec laquelle s'effectue le comptage et par le grand nombre de dilutions permettant d'ajuster les différentes concentrations cellulaires.

Nous avons estimé (BARRA et coll. 1972 *(17)*) que l'erreur sur la densité des sites de surface était de l'ordre de 16 °/o. Des améliorations technologiques devraient permettre d'améliorer la précision du résultat et de descendre au dessous de 10 °/o.

3) - LE TEST D'INHIBITION DE LA MOBILITE CELLULAIRE

Très élégant dans son principe, ce test présente les mêmes difficultés de mise en œuvre que le test d'inhibition de la mobilité des macrophages dont il dérive. Il paraît difficile à mettre en œuvre, en routine journalière du moins.

4) - LES METHODES AUTOMATISEES

Ce type de méthodes, en apparence idéal, nécessite un appareillage bien adapté et parfaitement étalonné.

La reproductibilité des résultats reste, à notre avis, à démontrer de façon irréfutable en ce qui concerne l'étude de l'agglutinabilité cellulaire.

5) - LES METHODES D'AGGLUTINATION CLASSIQUES

La simplicité et la rapidité d'exécution sont les grandes qualités de ces méthodes qui sont actuellement les plus couramment utilisées. Elles présentent cependant un grand nombre d'inconvénients dans la forme où elles ont été décrites.

En effet :

– Les paramètres de la réaction sont essentiellement variables d'un auteur à l'autre, et chez un même auteur, d'un système cellulaire à l'autre.

La Concanavaline A est préparée, purifiée et conservée de plusieurs manières différentes. La concentration en lectine varie entre 50 et 1.500 μg par ml. La concentration de la suspension cellulaire est également variable entre 1 et 5 x 10^6 cellules par ml. Enfin, les conditions de la réaction varient très largement (récipient, agitation, température ; solution-tampons utilisés, volume final du mélange lectine-cellules).

– Le temps au bout duquel l'agglutination est appréciée est également très variable. Certains auteurs ne font qu'une seule lecture à la 5me minute, ou à la 30me ; d'autres font 2 lectures à la 15me et à la 30me minutes. Dans tous les cas, ces techniques ne tiennent pas compte du caractère dynamique du phénomène d'agglutination et n'apprécient que le résultat global de la réaction au bout d'un temps donné sans se préoccuper de son allure cinétique.

– Plusieurs techniques n'apprécient pas l'importance de l'agglutination et répondent par tout ou rien. Un certain nombre d'autres adoptent une échelle de quantification de type sérologique en croix, méthode d'estimation dont on connaît le manque de précision et le caractère subjectif.

B – LA METHODE PROPOSEE

I SES BUTS

II SES BASES : ETUDE FONDAMENTALE DES PARAMETRES INTERVENANT DANS LA REACTION D'AGGLUTINATION CELLULAIRE PAR DES LECTINES

1) - LA REACTION D'AGGLUTINATION EN IMMUNOLOGIE

a) Caractères généraux,

b) Influence des facteurs non spécifiques,

c) Interprétation,

d) Quantification de l'Agglutination

2) - LA REACTION BIOCHIMIQUE ENZYME-SUBSTRAT

3) - INTERET DE CES DEUX MODELES

III DESCRIPTION DE LA METHODE PROPOSEE

1) - MATERIEL

2) - TEMPS PREPARATOIRES DE L'AGGLUTINATION

3) - LA TECHNIQUE D'AGGLUTINATION

a) Le test d'Agglutination,

b) Les témoins

4) - EXPRESSION DES RESULTATS : LA COURBE D'AGGLUTINATION

5) - EXPLOITATION DES RESULTATS

a) Détermination de la vitesse initiale d'agglutination,

b) Linéarisation de la courbe d'agglutination,

c) Détermination du coefficient d'agglutinabilité,

d) Détermination de l'unité agglutinante.

6) - SIGNIFICATION DU COEFFICIENT D'AGGLUTINABILITE et de L'UNITE AGGLUTINANTE

7) - CRITIQUE DE LA METHODE PROPOSEE

a) Causes d'erreur – Améliorations possibles,

b) Reproductibilité des résultats – Intervalle de significativité,

c) Spécificité

B – LA METHODE PROPOSEE

I - SES BUTS

Dans le Service de Recherche du C.R.A.C.M., après avoir utilisé l'une d'elles pendant quelques mois, nous avons été amenés à modifier un certain nombre des techniques précédemment décrites, de façon à mettre au point une méthode d'intérêt relativement général, très largement et directement applicable à un maximum de souches cellulaires.

La méthode retenue devait satisfaire à un certain nombre d'exigences souvent contradictoires :

– Coût peu élevé,

– Simplicité,

– Possibilité d'être réalisée avec un matériel limité et courant en un temps limité : la technique devait pouvoir être répétée plusieurs fois dans la même journée (en vue d'une étude cinétique des phénomènes).

– Sensibilité suffisante et cependant caractère large et discriminatif permettant l'analyse d'un grand nombre de souches cellulaires tant normales que transformées, d'origines très diverses et très différentes les unes des autres.

– N'exiger qu'une quantité limitée de cellules, produite facilement par le secteur de culture cellulaire voire par un laboratoire étranger.

– Reproductibilité surtout, d'une souche à l'autre, d'un jour à l'autre et d'un expérimentateur à l'autre, de façon à pouvoir valablement comparer entre elles deux ou plusieurs souches différentes ou la même souche à des moments différents de la culture.

Ce caractère de reproductibilité ne pouvait être acquis que par deux moyens : standardisation maxima des différents paramètres et choix d'une échelle de lecture et de quantification faisant appel à des procédés laissant le moins de place possible à la subjectivité de l'observateur.

De plus, la méthode adoptée devait tenir compte du caractère dynamique de la réaction d'agglutination et permettre d'étudier la cinétique de l'agglutination en fonction du temps.

II - SES BASES : ETUDE FONDAMENTALE DES PARAMETRES INTERVENANT DANS LA REACTION D'AGGLUTINATION CELLULAIRE PAR DES LECTINES

La mise au point d'une méthode d'agglutination exige une bonne connaissance des processus physico-chimiques fondamentaux présidant au phénomène d'agglutination cellulaire lui-même.

De nombreux auteurs ont souligné les analogies formelles existant entre l'action des lectines et :

– La réaction d'agglutination, très étudiée et utilisée en Immunologie et actuellement bien connue, d'une part,

– Et la réaction enzyme-substrat, très étudiée et également bien connue en Biochimie, d'autre part.

Nous nous proposons de rappeler ici les principaux caractères de la réaction d'agglutination immunologique et de la réaction biochimique enzyme-substrat puis de discuter l'analogie existant entre chacune de ces réactions et l'action des lectines ; enfin, d'essayer d'adapter ces différentes données à la réaction d'agglutination cellulaire par la Concanavaline A.

1) - LA REACTION D'AGGLUTINATION EN IMMUNOLOGIE

a) Caractères généraux

La réaction d'agglutination est une réaction antigène-anticorps dans laquelle un antigène de nature particulaire (agglutinogène) en suspension homogène dans une phase liquide est agglutiné par un anticorps dit agglutinant (agglutinine), la formation des agglutinats s'accompagnant de la clarification du milieu.

On peut distinguer :

– La réaction d'agglutination directe : le site antigénique fait partie intégrante de la particule agglutinée et la réaction s'effectue en milieu salin sans recours à aucun artifice.

– La réaction d'agglutination artificielle : le motif antigénique fait encore partie de la particule mais la réaction ne se fait pas en milieu salin seul et n'est rendue possible que par l'utilisation d'artifices.

– La réaction d'agglutination passive ou conditionnée : le site antigénique ne fait pas partie de la particule qui ne sert que de support passif. Cette agglutination passive peut elle même être directe ou artificielle.

Cette réaction d'agglutination est très utilisée en immuno-hématologie (hémagglutination pour la détermination des groupes sanguins par la méthode de BETH-VINCENT) et en bactériologie (détermination de nombreux séro-types bactériens).

Elle est caractérisée par sa très grande sensibilité (elle est environ mille fois plus sensible que la réaction de précipitation). Par contre, très influencée par de nombreux facteurs purement physico-chimiques, elle manque parfois de spécificité. On conçoit dès lors l'importance de l'étude et de la standardisation de ces facteurs aspécifiques.

b) Influence des facteurs non spécifiques

La présence d'électrolytes est indispensable pour l'apparition de l'agglutination qui se fait mal dans l'eau distillée ou au contraire se fait même en l'absence d'anticorps. Il existe une concentration optimale pour chaque système. En général, cette concentration optimale est celle d'une solution de NaCl 0,15M.

La présence de macromolécules protéiques (sérum – albumine bovine) ou polyosidiques (Dextran) favorise en général l'agglutination. Elle peut même rendre possible la réaction avec des anticorps dits " incomplets " ou " bloquants " qui ne sont pas agglutinants en milieu salin seul.

Le pH joue un grand rôle. A pH bas, on peut observer des agglutinations spontanées non spécifiques. Le pH optimum est en général compris entre 5 et 9 ; le plus souvent il est voisin de la neutralité.

La température optima varie également avec le système étudié. D'une façon très générale, l'élévation modérée de la température favorise la réaction en augmentant les mouvements particulaires (agitation thermique). La réaction est le plus souvent pratiquée à la température du laboratoire (22°) ou à l'étuve à 37°.

L'agitation mécanique accélère la réaction en rapprochant les particules et en augmentant la fréquence et l'énergie des chocs.

La concentration en agglutinogène est très importante. Elle influe de façon considérable sur le résultat et elle doit toujours être précisée. Il y a en général intérêt à travailler avec des suspensions peu denses mais déjà opaques avant l'agglutination.

La concentration en agglutinine enfin intervient également. Une concentration trop importante en anticorps peut donner lieu à un phénomène de pré-zone analogue à celui observé pour la réaction de précipitation et qui disparaît en présence d'une concentration saline plus forte (2 °/₀) ou en présence d'albumine.

Enfin, dans le cas précis de l'hémagglutination, le traitement par la trypsine des hématies peut favoriser l'agglutination par l'antisérum spécifique.

c) Interprétation

Comme toute réaction antigène-anticorps, et en particulier comme la réaction de précipitation, la réaction d'agglutination se déroule en deux temps.

Le premier temps, invisible, constant et en principe très spécifique, est constitué par l'union de l'antigène avec l'anticorps au niveau de deux parties très limitées et complémentaires de leur molécule, le site ou motif antigénique d'une part, le site anticorps d'autre part. La liaison entre les deux sites est de nature non covalente. Il s'agit de forces de VAN DER WAALS, de liaisons ioniques électrostatiques et de liaisons hydrogène .

Le second temps donne lieu à un phénomène spontanément visible et permet de différencier les différentes réactions antigène-anticorps. Il est inconstant et on est parfois amené à utiliser des méthodes complexes pour le mettre en évidence. Dans le cas de la réaction étudiée ici, il s'agit de l'agglutination de particules qui étaient en suspension homogène avant la réaction.

Cette agglutination a pu être expliquée de deux façons différentes et les tenants de chacune des théories se sont longtemps affrontés. Il est intéressant de décrire et de discuter chacune d'elles.

Une première théorie, soutenue par HEIDELBERGER accorde une place exclusive à la spécifité antigène-anticorps. Pour cet auteur, l'agglutination s'explique uniquement par la formation d'un réseau identique à celui postulé par MARRACK pour la réaction de précipitation, chaque particule d'antigène s'unissant à plusieurs molécules d'anticorps qui sont elles-mêmes unies à d'autres particules. La molécule d'anticorps établit véritablement une liaison mécanique, " un pont " entre deux particules d'où formation d'aggrégats massifs et visibles. A l'appui de cette théorie, HEIDELBERGER apporte le fait que la réaction d'agglutination donne lieu au phénomène de pré-zone par excès d'anticorps saturant la surface des particules. Les anticorps non agglutinants sont dits monovalents ou bloquants. Dans tous les cas, la non-agglutination est due à l'impossibilité pour les anticorps de former des ponts entre les cellules.

La seconde théorie, défendue par BORDET, accorde une place unique aux modifications physico-chimiques de la surface particulaire entraînées par la fixation de l'anticorps. Cette seconde théorie fait appel à des notions de biophysique qu'il nous paraît nécessaire de rappeler brièvement.

Les surfaces de séparation de phases (interfaces), en particulier les interfaces solide-liquide, possèdent une énergie différente de celle d'une portion intérieure du système et qui leur donne des propriétés particulières. Cette énergie, souvent négligeable devant celle qui dépend de la masse pour des objets d'assez grande dimension, devient très importante pour des objets de dimension microscopique, car avec la diminution de la

taille, le rapport surface/volume, c'est-à-dire surface/masse, augmente rapidement. Toute interface possède ainsi une énergie libre de surface qui peut être décomposée en énergie mécanique liée essentiellement à des phénomènes de tension superficielle, en énergie chimique liée à l'existence de valences non satisfaites et en énergie électrique.

Cette énergie électrique joue un rôle fondamental. Il est en effet exceptionnel que la surface de séparation entre les deux phases présente une répartition égale des charges électriques positives et négatives alors que celle-ci est nécessairement uniforme, au moins dans le cas de milieux conducteurs, à l'intérieur des phases considérées. Autrement dit, la surface d'un solide (conducteur ou non) au contact d'une solution ionique quelconque porte une charge électrique et présente par conséquent une différence de potentiel par rapport à l'intérieur du liquide.

La charge superficielle de la particule tient à deux causes :

– La matière constituant la surface est porteuse de groupements chargés (c'est le cas de la surface cellulaire qui porte à l'état normal et dans la grande majorité des cas des charges négatives liées à la composition polysaccharidique de la glycocalix).

– D'autre part, une surface neutre par elle-même peut voir se fixer à sa surface, par des phénomènes d'adsorption, des ions soit positifs soit négatifs, provenant de la solution qui la baigne.

La paroi étant ainsi chargée, on doit supposer que les ions présents dans la solution et les molécules d'eau elles-mêmes (qui se comportent comme des dipôles) ne restent pas uniformément répartis au voisinage de celle-ci. HELMHOLTZ, il y a plus d'un siècle, a admis qu'il existait au voisinage immédiat de la couche chargée de la paroi, une autre couche contenant uniquement des ions de signe contraire. L'ensemble des deux couches de signes inverses, l'une appartenant à la paroi, l'autre à la solution forme ce qu'on appelle la couche double de HELMHOLTZ. (figure n° 4a).

Cette hypothèse a été ensuite retouchée par GOUY. Il est en effet évident que l'agitation thermique des ions et des molécules d'eau doit entraîner une diffusion de la couche externe de HELMHOLTZ et l'établissement d'un certain équilibre de répartition qui dépend de la température et de la concentration ionique. En fait, du côté de la solution, il y a seulement une atmosphère ionique où les charges des deux signes tendent vers l'égalité à mesure qu'on s'éloigne de la paroi, avec création d'un gradient de potentiel, c'est la couche diffuse de GOUY, dont l'épaisseur peut excéder une centaine d'Angstroems. (figure n° 4 b)

La paroi étant chargée, son potentiel est différent de celui de l'intérieur de la solution qui peut être considéré comme étant au potentiel zéro. En effet, une particule sphérique de rayon r portant une charge électrique Q dans un milieu de constante diélectrique D se trouve portée à un potentiel $v=\frac{Q}{D.r}$. Le potentiel décroît en valeur

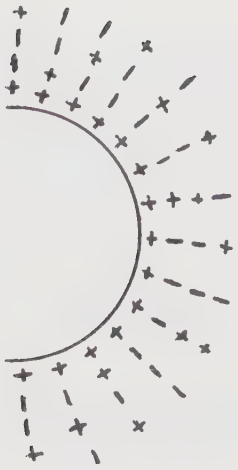
FIGURE Nº 4

4a – Représentation shématique de la Couche double de HELMHOLTZ

4b – Couche diffuse de GOUY

4c – Variations du potentiel électrique en fonction de la distance à la paroi d'une particule chargée. Expression graphique des potentiels thermodynamique et électrocinétique.

4_a



4_b

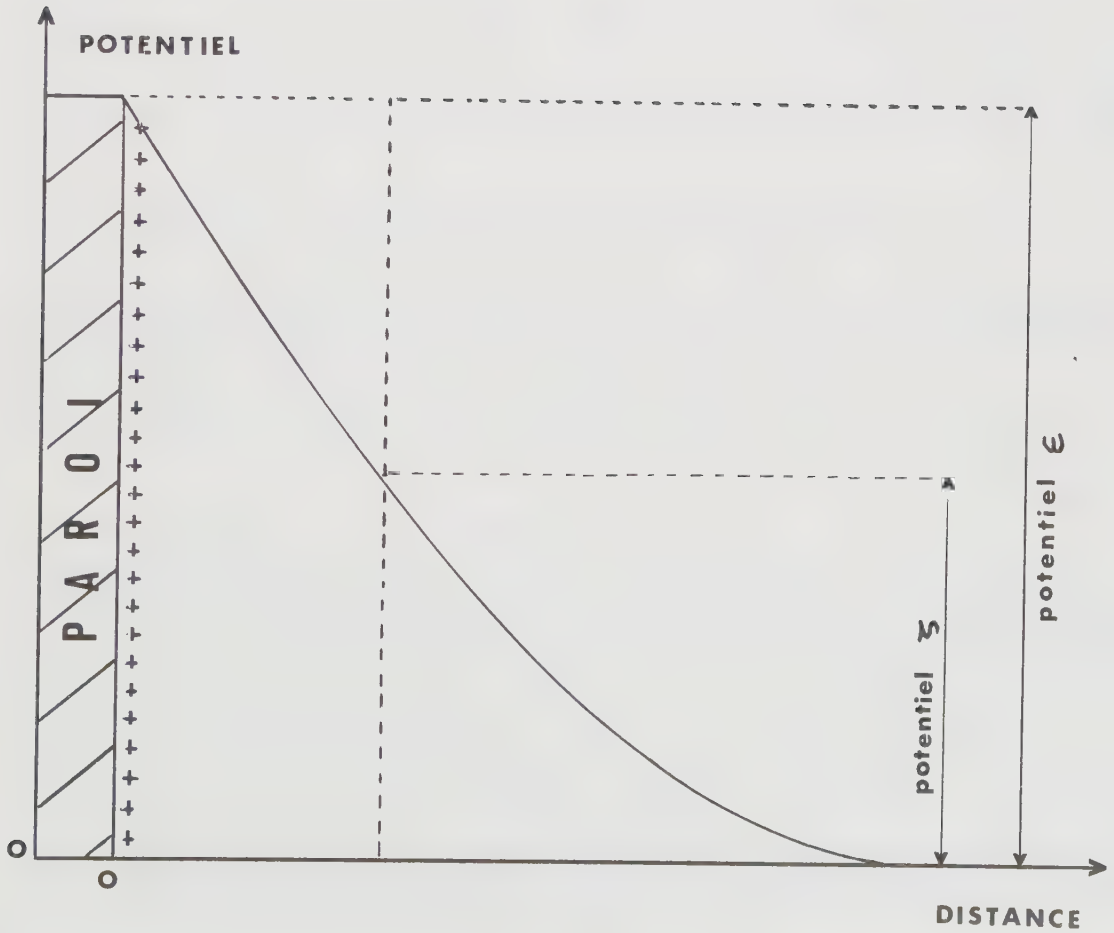


FIGURE n° 4_c

absolue quand on s'éloigne de la paroi en traversant la couche ionique diffuse de GOUY (figure nº 4c). Cette chute de potentiel représente le potentiel thermodynamique ε de la paroi. Dans le cas où la particule est en mouvement par rapport au liquide (ou inversement) une mince pellicule de liquide est entraînée par le mouvement, de sorte que le potentiel du système mobile (paroi plus couche adhérente) est inférieur à ε . Ce nouveau potentiel est le potentiel électrocinétique ou potentiel Zéta (ζ), qui est de l'ordre de -16 mV pour une cellule normale en suspension dans une solution physiologique. C'est le potentiel du plan de clivage qui conditionne les propriétés électrocinétiques de la particule.

Il est clair que le potentiel zéta est d'autant plus élevé que ε est lui-même élevé et d'autant plus faible que la couche diffuse est plus mince, ce qui arrive quand la force ionique de la solution augmente.

Au sein d'une suspension homogène de particules ainsi définies, s'exercent un certain nombre de forces interparticulaires qui agissent en empêchant ou en provoquant l'agrégation particulaire :

– Des forces répulsives, naturellement en faveur de la stabilité. Ce sont des forces coulombiennes, directement liées aux potentiels décrits ci-dessus, les particules de même espèce possédant dans le même milieu une charge nette de même signe. Dans cet état, les particules se rencontrent fréquemment au hasard du mouvement brownien mais glissent les unes sur les autres sans se toucher réellement ni s'aggréger.

– Des forces attractives. En l'absence d'affinité chimique, ce sont des forces de cohésion. Elles sont d'intensité différente suivant les propriétés de la surface des particules. Si celle-ci est hydrophobe, l'affinité pour l'eau est faible, ainsi que la tendance à la dissolution ; l'interface eau/particule a une énergie libre élevée. L'accolement s'accompagne d'une importante diminution de l'énergie libre interfaciale et les forces attractives sont grandes. Si la surface particulaire est hydrophile, au contraire, des molécules d'eau y sont fixées ; deux particules ne sont donc guère plus sollicitées l'une par l'autre que par les molécules d'eau libres : l'énergie interfaciale et les forces attractives sont faibles.

La stabilité de la suspension dépend naturellement de l'intensité relative des forces attractives et répulsives. Ce rapport est fonction de la distance interparticulaire d puisque les premières varient en $\frac{1}{d^6}$ et les secondes selon une loi grossièrement coulombienne en $\frac{1}{d^2}$ directement dépendante de la constante diélectrique du milieu.

La figure nº 5 suppose une particule B négativement chargée se dirigeant vers une particule A identique. La résultante des forces (en pointillé) devient positive en x : c'est à cette distance que l'attraction commence. Si l'énergie cinétique de B ne fournit pas la possibilité d'arriver jusque là en surmontant les forces répulsives, il n'y a pas accolement. Pour que celui-ci soit possible, il faut que le potentiel électrocinétique des particules tombe au dessous d'une certaine valeur qui est le potentiel critique ou seuil critique.

La formation d'aggrégats se produit ainsi chaque fois qu'elle entraîne une diminution de l'énergie libre de surface. Tout ce qui conduit à une diminution de l'importance de l'interface conduit à une diminution de l'énergie libre et se trouve donc thermodynamiquement favorisé (condition d'énergie minimale).

Il est clair qu'on peut amener l'agglutination :

– En augmentant les forces attractives, par diminution de la lyophilie par exemple,

– En diminuant les forces répulsives par diminution du potentiel électrocinétique, ce qui peut être obtenu par exemple en modifiant la constante diélectrique de l'eau par adjonction de sels ou de solvants ou de protéines.

Cette diminution des forces répulsives par diminution du potentiel électrocinétique zéta peut également être obtenue par la fixation sur la particule d'une molécule d'anticorps. Les anticorps 19 S de type Ig M diminuent (en valeur absolue) le potentiel zéta jusqu'aux environs de –7 mV et leur fixation à elle seule, peut entraîner l'agglutination. On sait, de plus qu'il y a transconformation réversible de l'anticorps au moment de sa fixation sur la particule. Les anticorps de type 7S, dont le poids moléculaire est nettement plus faible que celui des 19S ne peuvent abaisser suffisamment cette barrière de potentiel et ne sont presque jamais agglutinants. Il faut, dans ce cas avoir recours à des artifices destinés à abaisser artificiellement le potentiel zéta :

– Adjonction au milieu de substances macromoléculaires (solution d'albumine bovine à 20 ou 30 °/₀, sérum humain normal, gélatine, dextran),

– Traitement des cellules par des enzymes protéolytiques (trypsine, papaïne, fiscine) qui fait disparaître de la surface cellulaire des sucres réducteurs porteurs de charges négatives et diminue ainsi la charge nette de la particule.

– Utilisation de sérums anti-globulines comme dans le test de COOMBS,

– Augmentation de la force ionique (NaCl 2 °/₀).

A l'heure actuelle, il faut admettre que la formation de ponts intercellulaires par les anticorps agglutinants bivalents joue un rôle fondamental mais les modifications physico-chimiques et en particulier électriques de la surface des particules entrainées par la présence des anticorps constituent un facteur très important et souvent primordial du phénomène d'agglutination lui-même.

d) Quantification de l'agglutination

De nombreuses méthodes sont utilisées en Immunologie pour essayer de quantifier de façon aussi précise que possible la réaction d'agglutination.

FIGURE N° 5

Deux particules négativement chargées se dirigent l'une vers l'autre.

Elles sont soumises à deux types de forces :

– des forces d'attraction variant en $1/d^6$

– des forces de répulsion qui varient en $1/d^2$

La résultante dépend de la distance d séparant les deux particules. Elle est nulle pour $d = x$ et devient positive pour $d < x$.

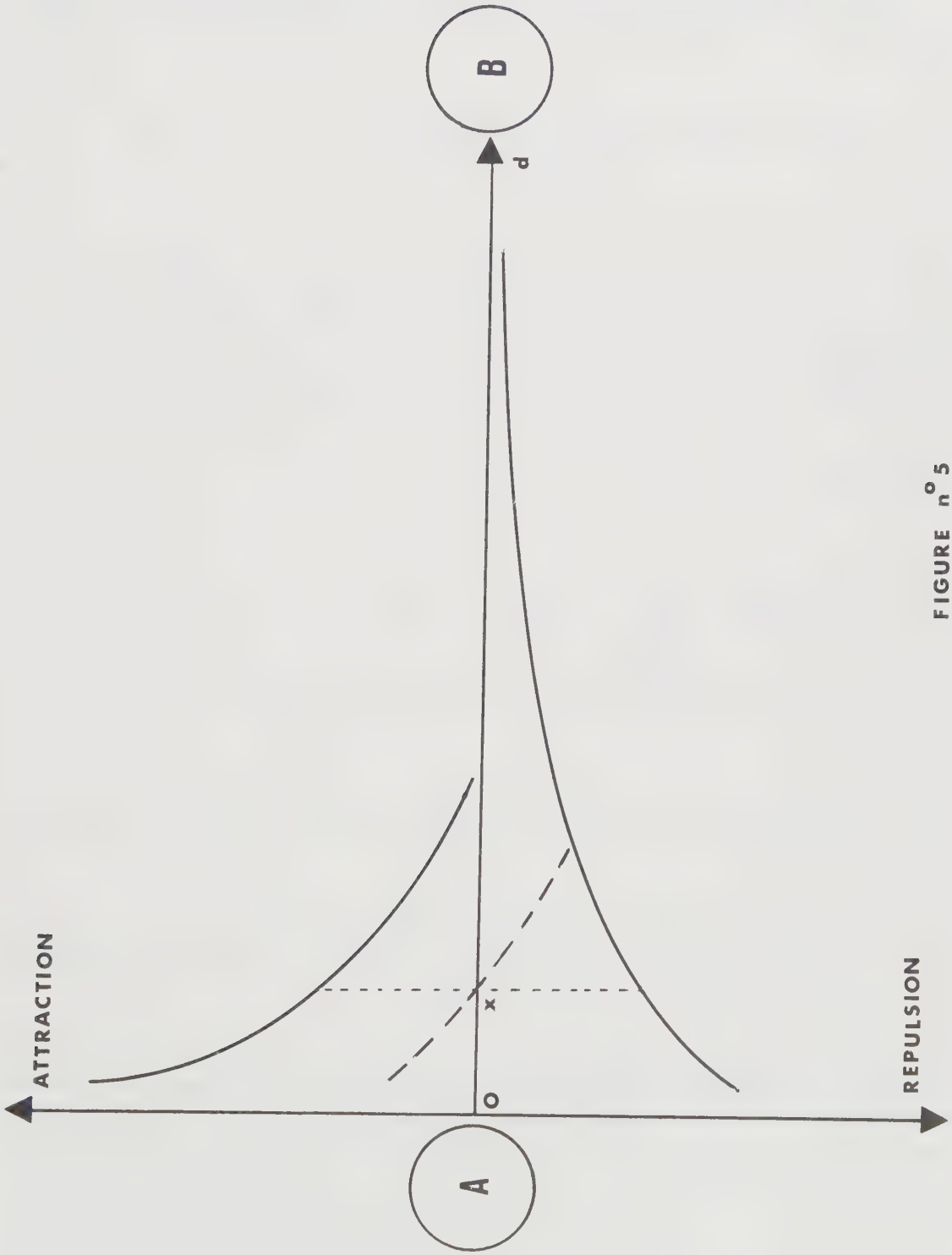


FIGURE n° 5

On peut distinguer des méthodes absolues, comme la mesure de l'azote-anticorps ou la mesure de la fixation de l'anticorps marqué par l'iode radioactif et des méthodes relatives.

Parmi ces dernières, une méthode est utilisée en immunohématologie et nous paraît intéressante à décrire : la méthode dite du N4.

Le N4 est le nombre d'hématies agglutinées par un sérum à 4°C dans des conditions standard.

La méthode consiste à mettre en présence 2 ml d'une dilution D constante d'un sérum décomplémenté à 56° pendant trente minutes avec 1 ml d'une suspension contenant un nombre croissant Nt d'hématies. (Nt est de l'ordre de 2×10^6 cellules). L'agglutination s'effectue sous agitation continue, dans des conditions standard (+4°C) pendant une heure. On prélève un aliquote du mélange et le nombre d'hématies libres Nl est compté à la cellule hématimétrique. Cela permet de déduire le nombre d'hématies agglutinées.

$$Na = Nt - Nl$$

On fait ensuite le rapport

$$\tau = \frac{Na}{Nt}$$

Si le rapport τ est compris entre 0,38 et 0,42, on a la relation

$$N4 = Na \times D$$

En pratique le N4 est proportionnel à la concentration du sérum : il existe une relation linéaire entre la dilution et le N4.

2) - LA REACTION BIOCHIMIQUE ENZYME-SUBSTRAT

Une enzyme est une protéine possédant des propriétés catalytiques grâce à son pouvoir d'activation spécifique (DIXON et WEBB).

Il est bien démontré maintenant (Victor HENRI 1902 et KEILIN et MANN 1937) que le premier stade de la réaction enzymatique consiste en une fixation de l'enzyme sur le substrat avec formation d'un " complexe enzyme-substrat ", lequel est ensuite dégradé en régénérant l'enzyme et en libérant les produits de la réaction. L'équation générale de la réaction est du type suivant :

$$E + S \underset{k2}{\overset{k1}{\rightleftarrows}} ES \xrightarrow{k3} E + P$$

où E est l'enzyme, S le substrat, P le produit et k1, k2 et k3 les constantes de vitesse de réaction.

La loi d'action de masse permet d'écrire :

$$K_{EQ} = K_m = \frac{k2 + k3}{k1} = \frac{[S] \times [E]}{[ES]}$$

La constante d'équilibre de la réaction se nomme constante de MICHAELIS, en l'honneur de MICHAELIS et MENTEN, qui en 1913 ont formulé pour la première fois une analyse mathématique satisfaisante de cette activité particulière. Elle a une énorme importance et peut se définir comme la concentration en substrat à l'instant où la vitesse de réaction atteint 50 % de la vitesse maximum. L'inverse de cette constante est une mesure de l'affinité de l'enzyme pour son substrat.

La courbe représentant la progression de la réaction enzymatique en fonction du temps (figure n° 6a), c'est-à-dire par exemple la quantité de substrat transformée en fonction du temps montre que la vitesse diminue avec le temps (aplatissement de la courbe), traduisant l'épuisement progressif du substrat et l'existence éventuelle de phénomènes perturbateurs. Les complications dues à l'interférence de différents facteurs capables de modifier la vitesse de la réaction peuvent être évitées en déterminant la vitesse avant qu'aucun de ces facteurs perturbateurs n'ait commencé à agir, c'est-à-dire, idéalement, au temps zéro. C'est ce qu'on réalise en déterminant la vitesse initiale de la réaction, qui est égale à la pente de la tangente à l'origine de la courbe de développement de la réaction (figure n° 6a).

De nombreux facteurs sont capables d'influencer la vitesse initiale d'une réaction enzymatique particulière. Il nous semble intéressant de les passer sommairement en revue. Ce sont essentiellement :

– La concentration en enzyme. En présence d'un très grand excès de substrat, la vitesse de la réaction est directement proportionnelle à la concentration en enzyme. $V = k\,(E)$

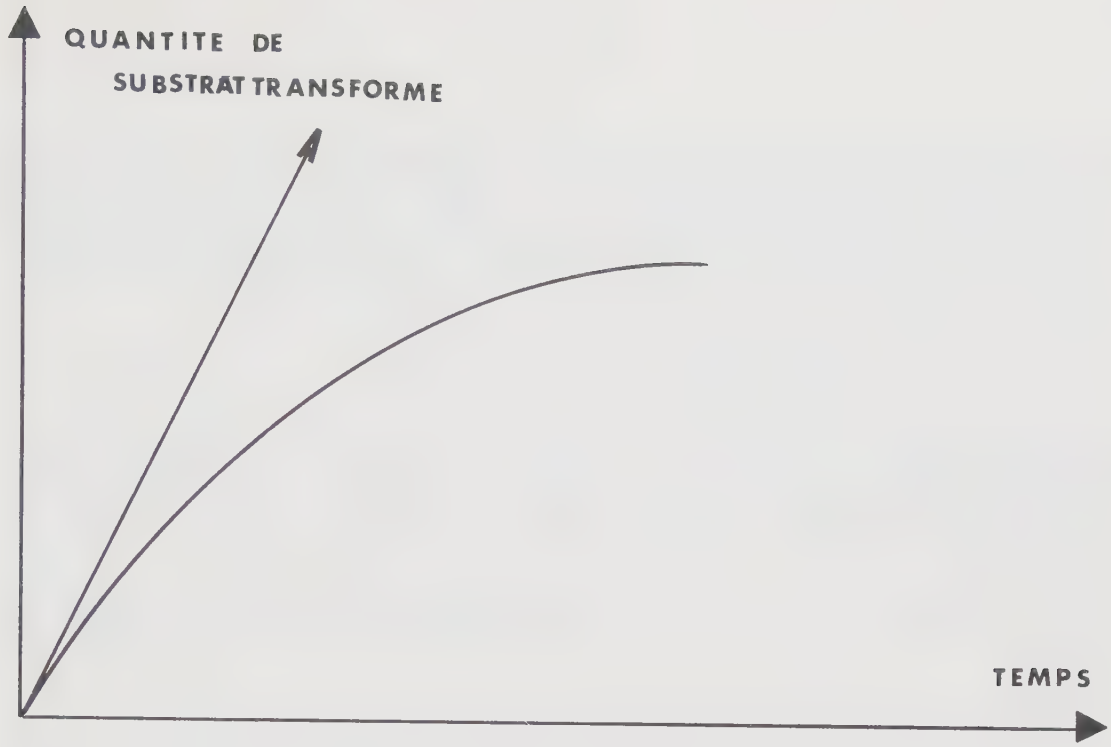
– La concentration en substrat. Pour les faibles concentrations en substrat, toutes les molécules d'enzyme ne sont pas saturées, c'est-à-dire impliquées dans un complexe enzyme-substrat, certaines sont libres, la vitesse initiale est faible et grossièrement proportionnelle à la concentration en substrat (Réaction d'ordre 1).

FIGURE Nº 6

6a - Courbe représentant la progression d'une réaction enzymatique (mesurée par la quantité de substrat transformé, en ordonnée) en fonction du temps (en abscisse).

6b - Courbe représentant les variations de la vitesse v d'une réaction enzymatique en fonction de la quantité de substrat.

Il s'agit d'une fonction homographique dont la représentation graphique est une hyperbole équilatère tendant asymptotiquement vers la vitesse maximum Vm.



6_a

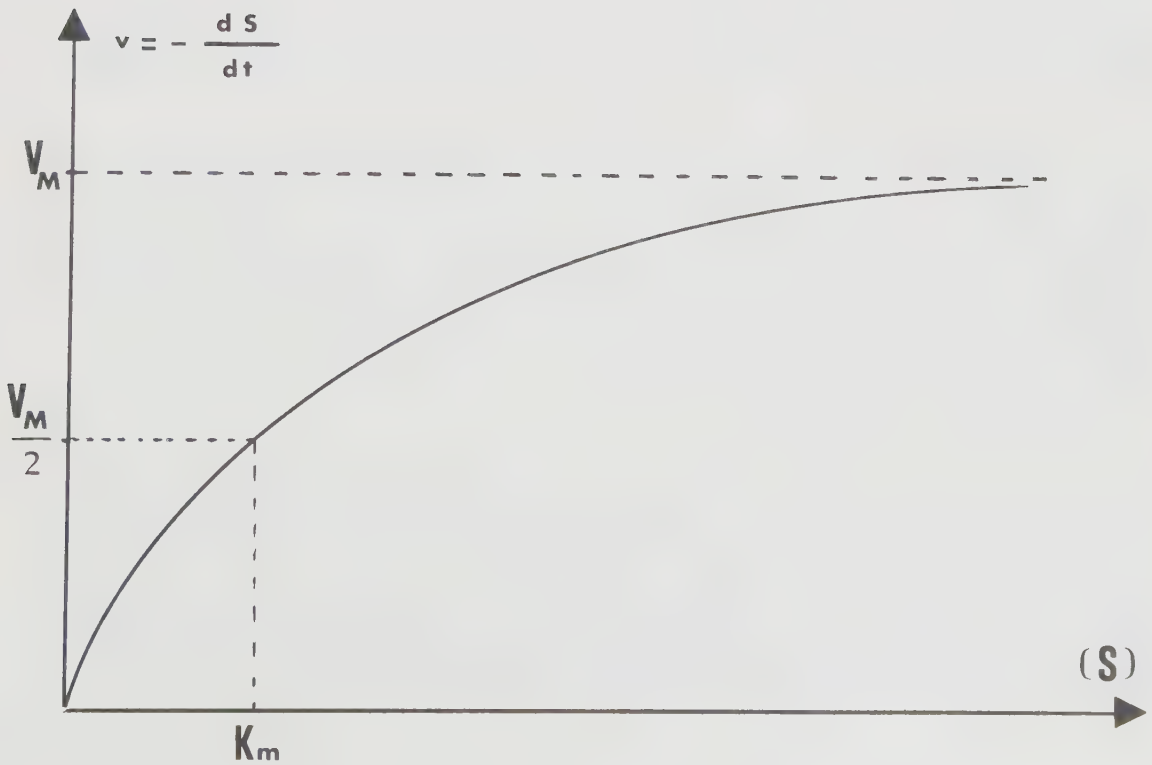


FIGURE n° 6_b

Puis la vitesse augmente de moins en moins vite au fur et à mesure que la concentration en substrat augmente pour tendre asymtotiquement vers une limite qui est la vitesse maximum de la réaction Vm (réaction d'ordre zéro). A ce moment, toutes les molécules d'enzymes sont saturées par le substrat et la vitesse dépend uniquement et directement de la concentration en enzyme. L'équation est une fonction de type homographique ;

$$V = \frac{Vm \quad [S]}{K_m + [S]}$$

et sa représentation graphique est un secteur d'hyperbole équilatère (figure n° 6b). Cette expression peut être linéarisée par plusieurs méthodes et en particulier par la représentation de LINEWEAVER et BURK en portant en abscisse l'inverse de la concentration en substrat et en ordonnée l'inverse de la vitesse.

– La température. Il existe une température optima de la réaction, résultante de deux actions antagonistes : l'activation par la température et la dénaturation thermique de l'enzyme.

– Le pH. Il existe également un pH optimum pour chaque réaction. Cette influence du pH tient à plusieurs facteurs : stabilité de l'enzyme, état électrique du centre actif et dissociation du substrat.

– La présence d'activateurs. Ce sont des cofacteurs augmentant la vitesse en amenant l'enzyme dans un état où elle est catalytiquement active, sans prendre part eux même à la réaction. Il s'agit souvent d'ions métalliques spécifiques, en particulier les ions Mg^{++} et les métaux de transition (Mn^{++}, Co^{++}, Cd^{++}, Zn^{++}, Fe^{++}) ou de substances à effet protecteur sur certains groupements nécessaires à l'activité enzymatique (composés réducteurs comme la cystéïne, protecteurs des groupements thiol).

– La présence d'inhibiteurs. On distingue les inhibiteurs irréversibles qui agissent en perturbant le centre actif de façon définitive et irréversible (substances dénaturantes des protéines) et les inhibiteurs réversibles. Ces derniers peuvent être compétitifs (analogues stériques se combinant à l'enzyme à la place du substrat et modifiant le Km de la réaction) ou non compétitifs (l'enzyme se combine simultanément au substrat et à l'inhibiteur sur 2 sites différents ; seule la vitesse Vm est affectée).

3) - INTERET DE CES DEUX MODELES

La réaction d'agglutination, et d'une façon plus générale la réaction immunologique antigène-anticorps, et la réaction biochimique enzyme-substrat présentent l'intérêt d'avoir été beaucoup étudiées et d'être bien connues, tant d'un point de vue pratique que théorique. Elles présentent toutes deux des analogies avec l'action des lectines et en particulier de la Concanavaline A et peuvent servir de modèle tant sur le plan méthodologique que sur le plan du formalisme mathématique dont nous devons essayer de nous rapprocher malgré les difficultés d'une telle approche.

L'action de la Concanavaline A est une réaction d'agglutination. Les particules d'agglutinogène sont ici des cellules vivantes, l'agglutinine multifonctionnelle est ici la molécule de Concanavaline A sous forme active. Seule la spécificité du phénomène change mais le déroulement du processus reste fondamentalement identique.

Tout ce qui a été dit au sujet de la réaction d'agglutination immunologique peut donc s'appliquer ici, et en particulier l'action des facteurs physico-chimiques aspécifiques, dont l'importance est probablement primordiale. Il faut cependant noter que nous n'avons jamais observé de " phénomène de zone " lors de la réaction d'agglutination avec la Concanavaline A. Le modèle faisant intervenir les modifications physico-chimiques de la surface paraît donc, à priori, être celui qui explique le mieux le processus. Dans le cas contraire, en effet, on aurait pu s'attendre à observer un phénomène de pré-zone en présence de très hautes concentrations en Concanavaline A, ce qui ne se produit jamais : la vitesse d'agglutination croît moins vite et éventuellement se stabilise dans les régions de hautes concentrations mais elle ne diminue jamais.

Le modèle de la réaction enzymatique, évoqué par certains auteurs, nous paraît plus éloigné du sujet. Certes, le premier temps est bien la fixation de la lectine sur la surface cellulaire avec formation d'un complexe lectine-cellule très analogue, à la taille près, au complexe enzyme-substrat, mais l'analogie semble devoir s'arrêter là. En particulier la reversibilité du phénomène et le turn-over paraissent nettement plus faibles. Comme pour la réaction d'agglutination, cependant, l'action des facteurs influençant la réaction est dans ce cas très importante et nous fournit encore un modèle intéressant.

A la lumière de ces deux modèles, nous avons donc effectué une étude aussi complète que possible des paramètres intervenant dans la réaction de façon à fixer les conditions optimales d'expérimentation.

La concentration en électrolytes est fixée par la nécessité d'effectuer la réaction en milieu parfaitement isotonique, puisque nous utilisons des cellules de mammifères vivantes. Le milieu utilisé est donc une solution-tampon phosphate de type PBS (phosphate buffered saline) qui a la même molarité qu'une solution de NaCl 0,15M. Ce tampon est utilisé incomplet, c'est-à-dire privé des sels de calcium et de magnésium pour la suspension des cellules (de façon à éviter au maximum les aggrégats aspécifiques) et complet, c'est-à-dire avec le calcium et le magnésium, pour la solution de Concanavaline dont l'activité exige la présence de cations métalliques bivalents et en particulier de calcium.

Le pH est tamponné à 7,40 dans les deux solutions, pour les mêmes raisons de survie des cellules et d'activité de la Concanavaline A.

La température, dans des limites comprises entre 10 et 37°C ne joue pratiquement aucun rôle, du moins dans le phenomène d'agglutination lui-même (nous verrons qu'elle a un rôle primordial dans la biosynthèse des sites de surface au niveau de la

cellule transformée). La réaction se pratique donc à la température du laboratoire, c'est-à-dire aux environs de 20° C.

L'agitation mécanique, par contre, a une importance énorme. La taille des particules agglutinées fait que, en l'absence d'agitation mécanique, l'agglutination est très faible, même pour une souche cellulaire très agglutinable. Les cellules ont tendance à se rassembler au fond de la boîte de réaction en une couche monocellulaire et ne sont plus capables d'être agglutinées. Nous avons essayé plusieurs méthodes d'agitation mécanique.

La plus simple consiste à imprimer à la main des mouvements doux aux boîtes tests ; cette méthode est cependant difficile à reproduire de façon rigoureuse et à standardiser. Les agitateurs mécaniques circulaires, du type de ceux utilisés en Immunologie pour les réactions de floculation (agitateur de KLINE) impriment un mouvement trop uniforme et beaucoup trop rapide empêchant la formation des agglutinats et dissociant les agglutinats déjà constitués. Finalement, le mode d'agitation le plus adapté est fourni par un agitateur électrique à bascule dont les caractéristiques, parfaitement définies, seront décrites avec la méthode dans un paragraphe suivant. Cet appareil permet de soumettre la réaction à une agitation douce, équilibrée, parfaitement définie et reproductible d'un test à l'autre.

La présence de macromolécules dans le milieu de réaction, et en particulier de protéines du sérum trouble la réaction et doit être évitée soigneusement. Cela tient probablement à deux faits ayant des conséquences opposées :

– Consommation d'une partie de l'agglutinine par le sérum et diminution de l'activité agglutinante de la préparation.

– Induction d'une réaction d'agglutination parfaitement aspécifique des cellules par un effet purement physico-chimique (diminution du potentiel électrocinétique). De même, et pour des raisons identiques, la présence de molécules polyosidiques doit être évitée avec soin.

Les ions métalliques, et en particulier les ions métalliques bivalents sont activateurs de la réaction, la rapprochant ainsi de certaines réactions enzymatiques.

Au contraire, l' α - D-méthyl-glucopyranose se comporte comme un inhibiteur compétitif de la réaction. A très petites doses (10^{-4} M), cette molécule diminue simplement la vitesse de réaction en diminuant l'agglutinabilité d'une souche donnée. A doses plus fortes (de l'ordre de 10^{-2} M), elle empêche complètement l'agglutination et s'est même montrée capable de dissocier des agglutinats déjà constitués.

La concentration de la suspension cellulaire et de la solution de Concanavaline à utiliser reste le facteur le plus important de la réaction. Les deux valeurs devaient être déterminées avec beaucoup de soin et nous avons testé des batteries de réactions correspondant à des valeurs différentes de chacune d'elles.

Nous avons étudié les cinétiques d'agglutination obtenues, une des concentrations restant fixe et l'autre variant dans des limites très larges. Ainsi, des suspensions cellulaires allant de 5×10^5 à 6×10^6 cellules par ml ont été agglutinées en présence de solutions de Concanavaline A à 200 et 400 μg par ml. Puis, nous avons mis en présence des quantités fixes de cellules (1×10^6, 2×10^6 et 3×10^6 cellules par ml) avec des quantités de Concanavaline A variant entre 0 et 600 μg par ml. Dans les deux cas, nous avons obtenu des familles de courbes entre lesquelles il a fallu choisir.

La concentration cellulaire retenue devait être comprise entre 1×10^6 et 2×10^6 cellules par ml. Nous avons choisi $1,5 \times 10^6$ cellules par ml. La suspension est déjà opaque avant l'agglutination et les agglutinats deviennent visibles à l'œil nu à partir du stade 3 tandis que la phase dispersante s'éclaircit. Au-dessous de cette concentration optima l'agglutination demande très longtemps pour être complète. Au-dessus, les stades deviennent difficiles à distinguer et, les cellules devenant pratiquement jointives, on peut observer, en particulier pour les très hautes concentrations (supérieures à 3×10^6), des agglutinations non spécifiques. De plus, dans ce cas, la réaction est extrêmement rapide et devient difficile à étudier avec précision.

La concentration en Concanavaline A a été plus difficile à fixer. Deux impératifs ont guidé ce choix. D'une part, il fallait que les doses soient saturantes pour la quantité de cellules mise en jeu et que la Concanavaline A ne soit pas le facteur limitant de la réaction. Cependant, pour que le test reste discriminatif, il ne fallait pas que la quantité utilisée puisse agglutiner toutes les souches cellulaires de la même façon. D'autre part, il fallait que la concentration choisie provoque la réaction en un temps qui soit à la fois suffisamment court pour que la réaction soit réalisable de façon répétée (moins d'une heure) et suffisamment long pour que les stades puissent être différenciés de façon correcte et que l'erreur relative commise sur ce temps soit faible (plus de 5 minutes). La concentration retenue, qui satisfait à ces différentes exigences est 200 μ g par ml.

Cette concentration est celle que nous utilisons pour les réactions d'agglutination que nous pratiquons. Elle est parfaitement adaptée à la souche cellulaire utilisée dans ce travail (BHK 21/C13) quel que soit son degré de transformation et permet d'assurer des résultats constants.

Le volume final du mélange sous lequel devait s'effectuer la réaction a, de même, été déterminé par approximations successives. Il a été fixé à 1 ml.

Le temps, enfin, au bout duquel devait être arrêtée la réaction a été choisi en fonction de données bibliographiques affirmant, en s'appuyant sur des expériences de fixation de la Concanavaline A marquée radioactivement sur la surface de cellules normales et transformées, que la quantité fixée était totale et stable (plateau) dès la 30me minute (BENBASSAT et coll. 1971 *(25)*).

III DESCRIPTION DE LA METHODE PROPOSEE

1) - MATERIEL

Tout le matériel utilisé (verrerie, pipettes) est lavé selon la technique courante utilisée pour le matériel de culture de tissus (c'est-à-dire un bain de 24 à 48 heures dans un agent décontaminant de type " 7X " puis 3 bains de 24 heures dans l'eau permutée, distillée et bidistillée successivement).

Les boîtes de PETRI en plastique de 35 mm (FALCON) doivent autant que possible être utilisées neuves. Elles peuvent être conservées pendant quelques jours dans un bain d'eau permutée renouvelé chaque jour. Mais cette pratique expose à de nombreuses rayures qui peuvent gêner la lecture.

Tout ce matériel est relavé 3 fois au moment de l'emploi avec la solution tampon. Cette précaution indispensable permet d'éliminer au maximum la présence de poussières très néfastes à la poursuite de l'expérience. Les cellules, en effet, ont tendance à s'assembler de façon aspécifique autour de ces débris en donnant des agglutinats difficiles à interpréter.

Le tampon phosphate (dit " incomplet ") utilisé, a la composition suivante :

NaCl	8 g	PO_4H_2K	0,2 g
KCl	0,2 g	H_2O	1 000 ml
$PO_4HNa_2\ 12H_2O$	1,44 g		

son pH est ajusté à 7,40 au pH-mètre avec une solution de soude normale.

La solution d'EDTA est obtenue en ajoutant 0,02 °/o d'acide éthylène-diamino tétra acétique au tampon incomplet décrit ci-dessus. Son pH est également ajusté à 7,40.

La Concanavaline A est mise en solution dans un tampon phosphate " complet " comprenant 0,1 g de $MgCl_2$ et 0,1 g de $CaCl_2$ par litre.

2) - TEMPS PREPARATOIRES DE L'AGGLUTINATION

Les flacons de culture de cellules sont vidés de leur milieu et le tapis cellulaire est lavé 2 fois avec 5 ml de tampon phosphate sans calcium ni magnésium, à 37°C pendant une durée totale de l'ordre de 5 minutes. Ce lavage soigneux a pour but d'éliminer de façon aussi parfaite que possible les cellules mortes ou en souffrance, décollées ou mal collées au verre et qui pourraient réagir de façon différente des cellules normales dans la suite de l'expérience. Il permet également d'éliminer le calcium et le magnésium et, en facilitant le décollement des cellules du verre, de réduire au maximum le temps d'action de l'EDTA dont l'action nocive sur les cellules vivantes est probable.

L'emploi de la trypsine étant proscrit de façon formelle, les cellules sont ensuite détachées du verre par action de 5 ml de solution d'EDTA, à l'étuve à 37°C.

Le temps d'action de l'EDTA est variable avec le type cellulaire étudié. Il doit être aussi bref que possible. En règle générale, nous laissons le chélateur agir jusqu'à ce que les premières cellules commencent à se décoller, ce qui se traduit par un aspect opaque de la culture, puis nous accélérons le processus par une série d'aspirations et de refoulements successifs à la poire montée sur une pipette PASTEUR. Pour la souche BHK21/C13, ce temps est de l'ordre de 2 à 3 minutes ; il a toujours été inférieur à 5 minutes.

La suspension cellulaire ainsi obtenue est transférée dans des tubes coniques préalablement siliconés (de façon à diminuer les pertes cellulaires).

Elle est soumise à une centrifugation à 700 g pendant 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire lavé 2 fois avec le tampon phosphate incomplet.

Les cellules sont comptées à la cellule hématimétrique (type cellule de MALASSEZ) et la concentration cellulaire est ajustée à $1,5 \times 10^6$ cellules par ml. Cet ajustement doit être fait de façon très précise car la concentration intervient de façon très importante dans le résultat. Une numération des cellules prenant la coloration par le bleu EVANS donne la proportion de cellules non vivantes dans la préparation. En fait, cette précaution est le plus souvent inutile. La technique, quand elle est correctement exécutée sur une culture cellulaire de bonne qualité, est très peu traumatisante et le nombre des cellules mortes paraît vraiment négligeable.

La Concanavaline est utilisée en solution à 200 μg par ml, en solution dans du tampon phosphate complet. Là encore, la concentration doit être ajustée avec soin.

3) - LA TECHNIQUE D'AGGLUTINATION

a) Le test d'Agglutination

L'agglutination elle-même est effectuée en boîte de PETRI de 35 mm de diamètre, à la température du laboratoire, sous un volume total de 1 ml.

Ce volume est constitué de 0,5 ml de suspension cellulaire préalablement rendue bien homogène par aspiration et refoulement successifs à la pipette auquel, au temps zéro, est ajouté 0,5 ml de solution de Concanavaline A.

Les boîtes sont alors soumises à une agitation continue grâce à un agitateur à bascule (APELAB) effectuant 10 cycles par minute avec une amplitude de 3 cm de part et d'autre de sa position d'équilibre.

FIGURE N° 7

AGGLUTINATION PAR LA CONCANAVALINE A DE CELLULES TRANSFORMEES PAR LE VIRUS POLYOME

Représentation des stades d'agglutination.

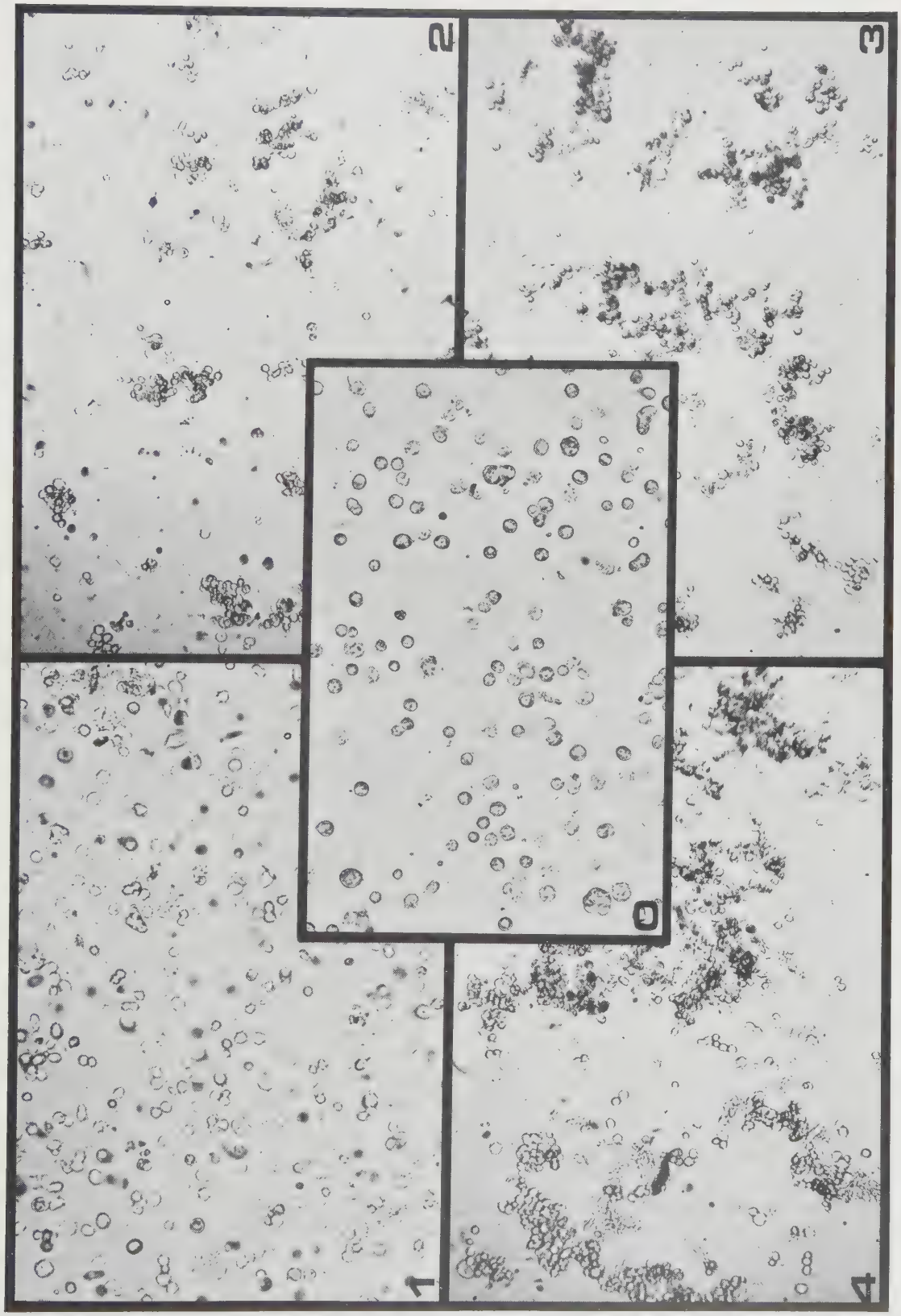


Figure Nº 7

Pour tenir compte du caractère dynamique du phénomène étudié, nous chronométrons le temps écoulé depuis l'adjonction de la Concanavaline A et l'agglutination est lue toutes les minutes pendant trente minutes au microscope inversé. Nous utilisons un grandissement moyen (x 60) pour lire l'agglutination en général et un grandissement plus fort (x 100) pour compter les cellules de façon précise au sein des agglutinats.

La photographie permet d'objectiver un certain nombre de stades significatifs et laisse des documents qui peuvent être conservés et analysés par la suite de façon détaillée (figure nº 7).

L'agglutination est cotée non pas en croix mais selon une échelle numérique en cinq stades notés de 0 à 4 et qui tiennent compte des deux critères suivants :

– Le pourcentage de cellules agglutinées,

– Le nombre moyen de cellules par agglutinat. Les critères caractéristiques de chaque stade sont reportés dans le tableau nº 5. Ils sont fixés par convention et ont été déterminés après une étude critique sur documents photographiques d'un grand nombre d'agglutinations effectuées avec des souches cellulaires différentes par deux observateurs différents.

b) Les témoins

Les boîtes témoins ont une grande importance. Elles sont traitées de la même façon que les boîtes tests.

Dans le témoin-cellules, la solution de Concanavaline est remplacée par 0,5 ml de tampon phosphate incomplet. La validité du test n'est assuré que si les cellules témoins restent en-dessous du stade 1 jusqu'à la trentième minute, ce qui traduit une absence d'auto-agglutination spontanée durant toute l'expérience.

Dans le témoin-Concanavaline A, nous mettons une suspension à 2 °/₀ de globules rouges de mouton lavés, ou, plus souvent, une souche cellulaire d'agglutinabilité connue et stable. Ce témoin doit être complètement agglutiné à la fin de l'expérience (stade 4).

4) - EXPRESSION DES RESULTATS : LA COURBE D'AGGLUTINATION

En portant :

– En ordonnée le stade d'agglutination (qui peut varier de zéro à quatre),

– En abscisse le temps (variant entre zéro et trente minutes).

Nous pouvons tracer la courbe représentant les variations de l'agglutination de la souche considérée en fonction du temps (figure nº 8).

FIGURE N° 8

COURBE D'AGGLUTINATION CELLULAIRE PAR LA CONCANAVALINE A

En abscisse : le temps (en minutes)

En ordonnée : le stade d'agglutination

La Concentration en Concanavaline A est fixée à la valeur de 200 g par ml.

On peut définir 4 paramètres :

– le temps de latence (t)

– le stade maximum d'agglutination (A)

– le temps nécessaire pour atteindre ce stade maximum (T)

– la pente (P) de la tangente à l'origine à la courbe d'agglutination

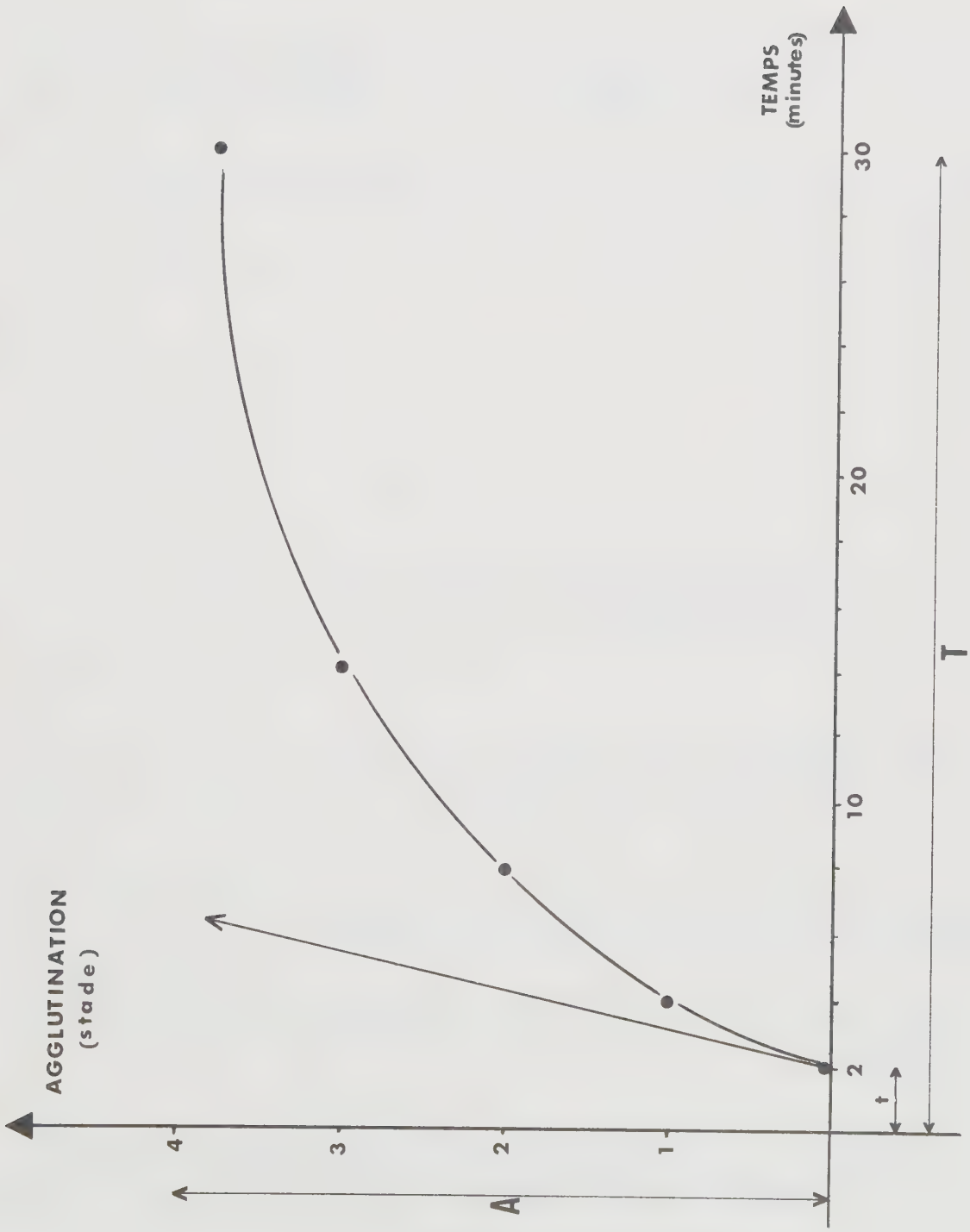


FIGURE n° 8

TABLEAU N° 5

STADE	POURCENTAGE DE CELLULES AGGLUTINEES	NOMBRE MOYEN DE CELLULES PAR AGGLUTINAT
0 (–)	⩽ 40 °/o	⩽ 3
1 (+)	60 °/o	3 à 5
2 (++)	75 °/o	5 à 25
3 (+++)	90 °/o	25 à 60
4 (++++)	⩾ 96 °/o	> 60 (incomptables)

CONVENTIONS RELATIVES AUX STADES D'AGGLUTINATION CELLULAIRE PAR LA CONCANAVALINE A

L'étude d'une telle courbe montre que, d'une façon très générale, le phénomène :

– Présente un temps de latence t, précédant le début de l'agglutination (stade 0),

– Augmente ensuite avec le temps suivant une loi mathématique de type homographique dont la représentation graphique est hyperbolique,

– Tend enfin asymptotiquement vers un plateau, témoignant de la saturation du phénomène. Ce plateau s'établit à partir d'un temps T et pour une valeur de l'agglutination A.

L'allure de la courbe d'agglutination et les trois paramètres qu'elle permet de déterminer (t, T et A) sont, dans les conditions bien précises qui ont été définies, parfaitement caractéristiques de la souche cellulaire étudiée.

5) - EXPLOITATION DES RESULTATS

La courbe d'agglutination et les trois paramètres qui en dérivent étant lourds à manipuler de façon courante, il nous a semblé nécessaire, dans un but de simplification et de standardisation des résultats, de tirer de ces données un paramètre unique, capable de représenter à lui tout seul l'état de surface de la souche testée.

Aucun des paramètres décrits ci-dessus (t, T et A) pris isolément ne nous a semblé avoir le caractère de généralité suffisant pour décrire à lui tout seul la réactivité de la souche cellulaire vis à vis de la Concanavaline A. L'étude mathématique rigoureuse de la courbe d'agglutination, elle non plus, ne peut remplir cet office ; elle est de plus difficile à réaliser en routine.

Nous avons donc été amenés à utiliser un certain nombre d'artifices mathématiques, rendant la méthode très générale.

a) Détermination de la vitesse initiale d'agglutination

La première solution est une solution graphique.

Elle consiste à tracer la droite tangente à l'origine à la courbe d'agglutination (figure n°8).

La pente P de cette droite, c'est-à-dire la tangente trigonométrique de l'angle déterminé par la droite et l'axe des abscisses est en fait la vitesse initiale du phénomène d'agglutination en présence de Concanavaline A.

La détermination graphique de P est simple et rapide. Ce paramètre, cependant, ne tient pas compte du temps de latence t ni du stade final d'agglutination A et ne donne que la vitesse initiale du processus, sans décrire l'évolution ultérieure du système.

b) Linéarisation de la courbe d'agglutination

Dans un second temps, nous déterminons, par extrapolation de la courbe expérimentale, la valeur à l'origine k, limite du stade d'agglutination quand le temps tend vers zéro (figure n° 9a).

En portant en abscisse l'inverse du temps

$$T' = \frac{1}{T}$$

et en ordonnée l'inverse du stade d'agglutination diminué de la constante k décrite ci-dessus

$$A' = \frac{1}{A-k}$$

FIGURE Nº 9

LINEARISATION DE LA COURBE D'AGGLUTINATION

9a - Détermination de la valeur k, limite, quand T tend vers zéro de la variable A

9b - Représentation linéaire du phénomène d'agglutination

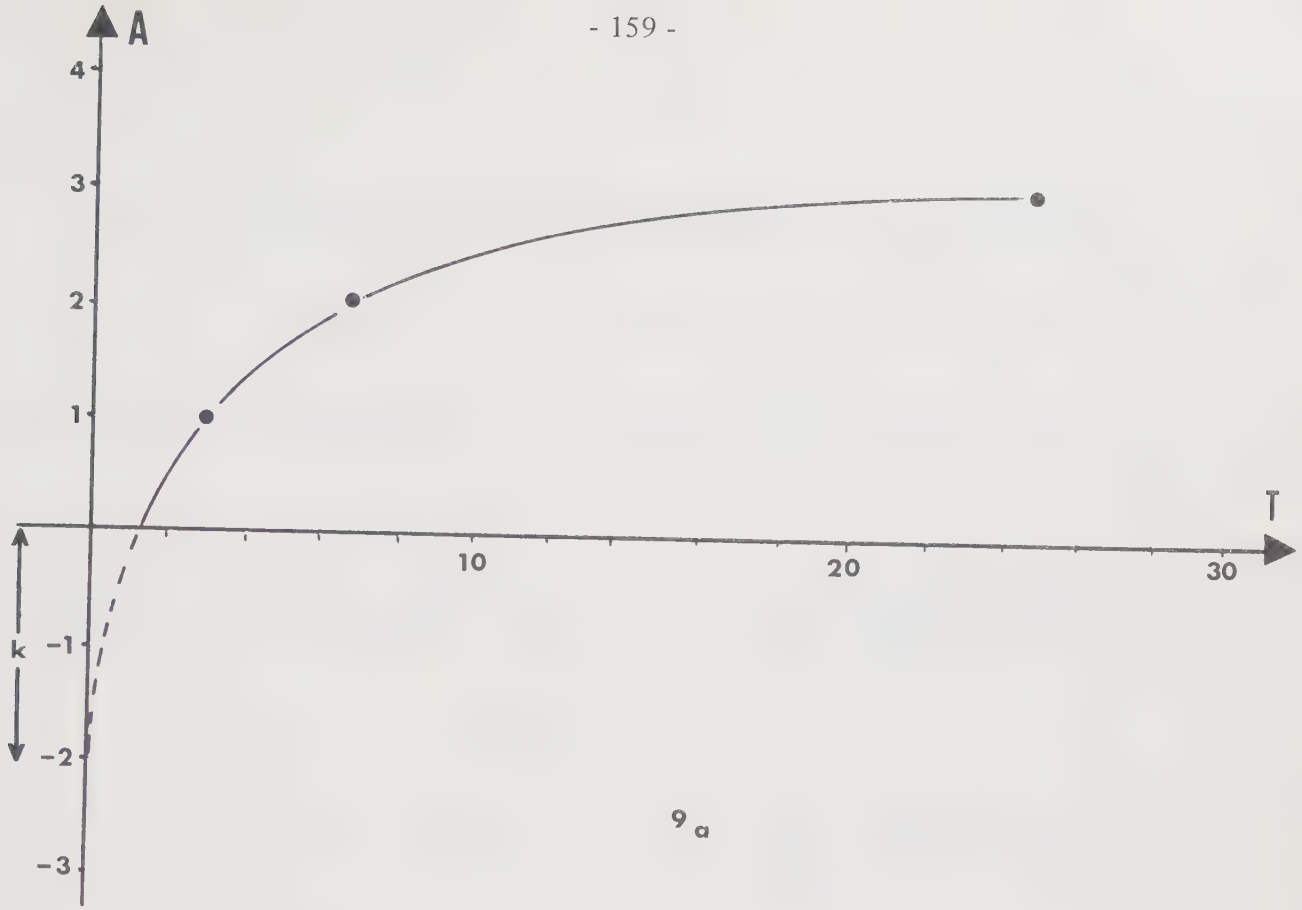
En abscisse : $T' = \frac{1}{T}$

En ordonnée : $A' = \frac{1}{A-k}$

La droite ainsi construite a pour équation

$$A' = pT' + b$$

On détermine graphiquement la valeur de la pente p.



9 a

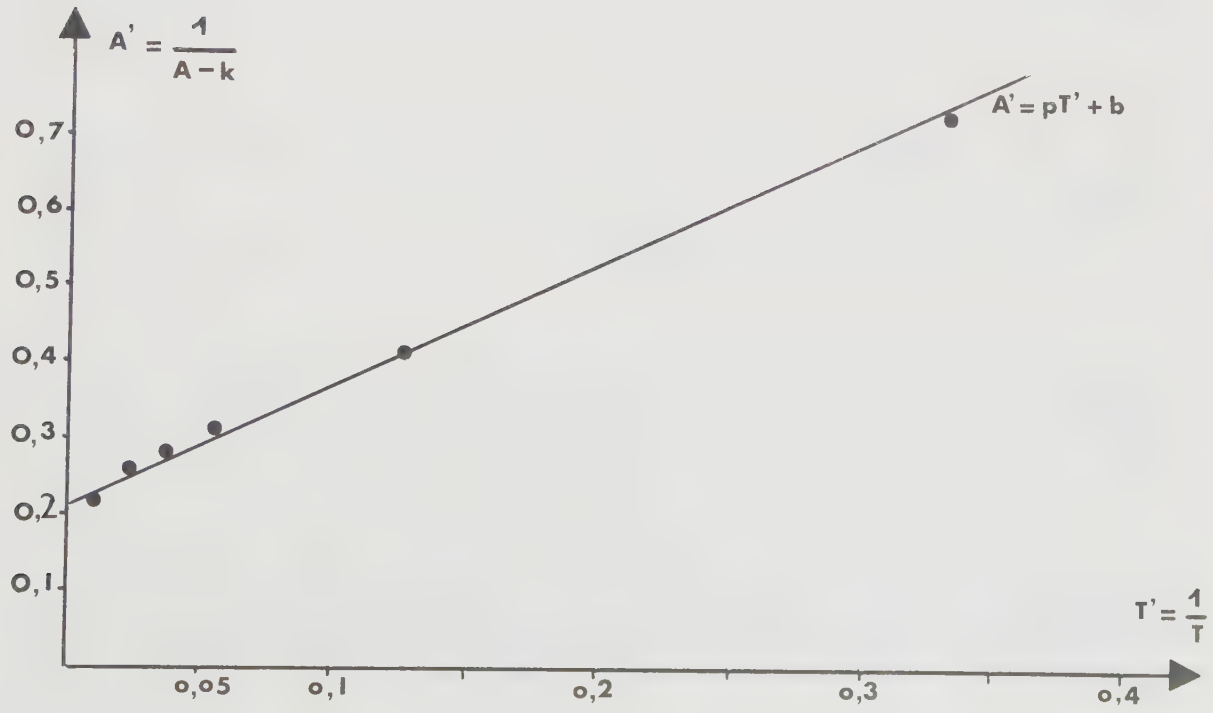


FIGURE n° 9 b

On obtient une représentation linéaire du phénomène (figure nº 9b) dont l'équation est de la forme

$$A' = pT' + b$$

La constante b est l'ordonnée à l'origine de la droite et n'a pas de valeur représentative. La pente p de cette droite par contre constitue un paramètre parfaitement représentatif de l'état de la souche au moment considéré (DE MICCO et MEYER 1971 *(179)*).

Cette méthode, parfaitement fondée sur le plan mathématique et qui tient compte de tous les paramètres, présente l'inconvénient de nécessiter des calculs longs et fastidieux. Elle est difficile à réaliser de façon courante. Nous la réservons actuellement à la vérification des données de la suivante.

c) - Détermination du coefficient d'agglutinabilité

Enfin, nous calculons un coefficient d'agglutinabilité α, déterminé au moyen de la relation semi-empirique suivante :

$$\alpha = \frac{10\ A^2}{T + t}$$

Ce coefficient s'exprime en unités arbitraires. Dans les conditions expérimentales rigoureuses définies précédemment, il varie entre 0,25 et 25 environ. Il tient compte des trois paramètres issus de la courbe d'agglutination et en particulier du temps de latence. De plus, il fait intervenir le carré du stade final d'agglutination A, paramètre que de nombreux auteurs considèrent comme fondamental.

Cette méthode, d'une grande simplicité et très facilement reproductible, permet d'affecter chaque souche cellulaire testée d'un coefficient α unique dont les variations décrivent de façon très satisfaisante l'état de surface de la souche.

d) Détermination de l'unité agglutinante

Une méthode différente, mais complémentaire de la précédente consiste à observer le stade d'agglutination A atteint au bout d'un temps T=30 minutes quand la concentration en Concanavaline A varie de 0 à 600 μg par ml. On obtient une courbe en S caractéristique qui est approximativement linéaire entre 10 μg par ml et 40 μg par ml et présente un plateau à partir de 100 μg par ml (figure nº 10).

A partir de cette courbe, nous avons été amenés à définir une unité agglutinante (uA), quantité de Concanavaline A qui, dans les conditions d'agglutination standard définies précédemment, est capable de porter une souche donnée à un stade 2 d'agglutination, (c'est-à-dire à la moitié du stade maximum) en 30 minutes. L'unité agglutinante s'exprime en micro-grammes de Concanavaline A par ml.

Cette méthode souffre, comme les tests de consommation, du grand nombre de cellules exigé par chaque détermination.

6) - SIGNIFICATION DU COEFFICIENT D'AGGLUTINABILITE ET DE L'UNITE AGGLUTINANTE

Sur un plan mathématique, le coefficient α, quotient d'un stade d'agglutination par un temps, a les dimensions d'une vitesse de réaction.

La variation de α est :

– Proportionnelle au carré du stade d'agglutination maximum A^2 (et le coefficient 10 dont ce paramètre est affecté n'a pour but que de diminuer le nombre de chiffres après la virgule),

– Inversement proportionnelle au temps total nécessaire pour atteindre le plateau T,

– Inversement proportionnelle au temps de latence du phénomène t, qui intervient ainsi deux fois au dénominateur puisqu'il est déjà compté dans la valeur de T.

D'un point de vue physico-chimique, le coefficient α mesure le caractère plus ou moins agglutinable de la souche étudiée, donc l'affinité de cette souche pour la Concanavaline A, c'est-à-dire, en dernier ressort, l'importance des modifications de surface permettant à la cellule d'être agglutinée par la Concanavaline A.

L'unité agglutinante est déterminée graphiquement. Elle présente de grosses analogies avec l'unité hémolysante 50 °/o utilisée dans le phénomène d'immuno-hémolyse. Elle a été choisie de façon à se trouver, elle aussi au niveau de la courbe où les variations, à peu près linéaires, sont les plus importantes et l'on sait en Immunologie que le point le plus précis est le point d'hémolyse 50 °/o et non celui d'hémolyse totale.

Il est clair que l'unité agglutinante et le coefficient α d'agglutinabilité sont les témoins du même phénomène. Ils varient en sens inverse et pour une souche cellulaire donnée, plus le coefficient α est élevé (c'est-à-dire plus l'affinité de la souche pour la Concanavaline A est grande) et plus l'unité agglutinante est faible (c'est-à-dire plus faible est la quantité de lectine nécessaire pour porter la souche au stade d'agglutination 2).

Coefficient d'agglutinabilité et unité agglutinante sont deux paramètres complémentaires permettant de connaître de façon rapide et simple la réactivité d'une souche cellulaire vis-à-vis de la Concanavaline A.

FIGURE Nº 10

DETERMINATION DE L'UNITE AGGLUTINANTE

En abscisse, en coordonnées logarithmiques, la Concentration en Concanavaline A comprise entre 0 et 600 μg par ml.

En ordonnée, le stade d'agglutination observé.

Entre 10 et 40 μg par ml., la représentation est linéaire.

L'unité agglutinante (uA) est la Concentration en Concanavaline A portant une souche cellulaire donnée au stade 2 d'agglutination en 30 minutes dans les conditions bien précises qui ont été définies.

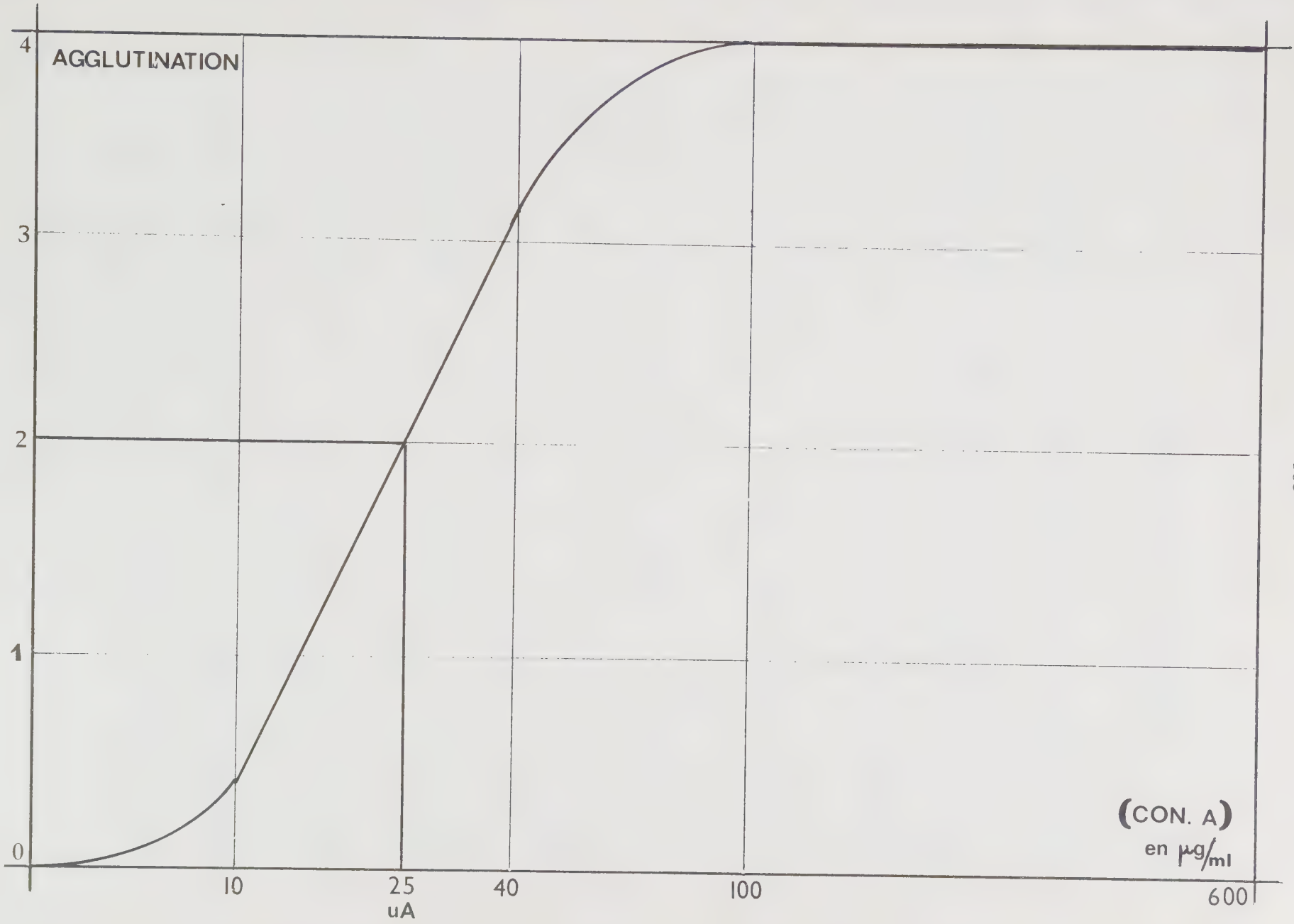


FIGURE n° 10

7) - CRITIQUE DE LA METHODE PROPOSEE

a) Causes d'erreur

Les causes d'erreur sont nombreuses et tiennent à de nombreux facteurs, mais elles peuvent être évitées par une mise en œuvre très rigoureuse de la technique.

L'activité de la Concanavaline A n'est pas parfaitement stable au cours du temps. Elle doit être testée de façon fréquente soit par la capacité d'agglutiner les hématies de mouton soit par agglutination d'une souche cellulaire connue servant d'étalon. Nous utilisons pour notre part la souche CT54 qui a été décrite précédemment et dont les caractères sont parfaitement établis et stables. Cette souche est agglutinée de façon très reproductible jusqu'au stade 4 en 15 minutes environ.

La concentration en Concanavaline A peut être ajustée de façon précise par l'utilisation de pipettes graduées très précises et en effectuant les pipetages entre 2 traits. La précision de la concentration en cellules par contre, est limitée par l'erreur commise au moment de la numération. Avec la cellule hématimétrique de MALASSEZ, cette erreur est de l'ordre de 10 °/o. La concentration en cellules intervenant de façon très importante dans le résultat, il s'agit là d'une limite de la méthode.

La technique exige un matériel de qualité parfaite et une certaine minutie. Le lavage en particulier doit être très soigneux car toute particule non cellulaire entraîne la formation d'agglutinats non spécifiques qui sont difficiles à distinguer des agglutinats provoqués par la Concanavaline A et qui de plus appauvrissent le milieu en cellules réactives.

Le temps écoulé depuis l'adjonction de la Concanavaline A est mesuré avec un chronomètre et est connu avec une grande précision. L'appréciation du stade d'agglutination, par contre, malgré l'adoption de conventions très bien définies, reste partiellement subjective et varie avec l'observateur. La reproductibilité des résultats sera discutée dans un paragraphe ultérieur.

Enfin, et il s'agit là à notre avis de la limite la plus importante, il faut noter l'influence considérable des conditions de culture sur l'état de la surface cellulaire et donc sur l'agglutinabilité des cellules testées. Le coefficient α varie, en effet, de façon importante pour une même souche cellulaire avec :

– La composition du milieu de culture, et en particulier avec la teneur de ce milieu en sérum de veau,

– La température de la culture,

– L'âge de la culture,

– La densité de saturation : une culture non confluente n'a pas le même coefficient d'agglutinabilité que la même culture arrivée à inhibition de contact.

Le problème s'est posé récemment de savoir si la concentration de Concanavaline A utilisée (200 μ g par ml.), parfaitement adaptée au système cellulaire étudié ici (BHK 21/C13) était suffisante pour toutes les souches cellulaires, et si, en particulier pour les cellules hautement transformées, cette quantité était saturante et ne constituait pas un facteur limitant de la réaction. Dans ce cas, et à partir d'une certaine valeur, très haute (voisine de 25) du coefficient d'agglutinabilité α il serait difficile de faire la différence entre deux souches très transformées.

Il s'agirait là d'une limite susceptible de réduire la généralité de la méthode et des expériences de consommation effectuées avec des souches très tumorigènes doivent nous apprendre s'il convient d'augmenter la concentration pour ce type de systèmes.

Ces diverses causes d'erreur nous semblent devoir être réduites en dirigeant les efforts dans trois directions :

– Réduction des facteurs subjectifs d'appréciation en particulier par l'utilisation systématique de la photographie, voire de techniques microcinématographiques permettant une étude parfaitement objective du phénomène,

– Standardisation très poussée de paramètres intervenant dans le résultat et tout spécialement les conditions de culture qui doivent êre parfaitement identiques d'un test à l'autre, la concentration en cellules et l'agitation du milieu réactionnel qui doit être automatisée,

– Etude mathématique rigoureuse du phénomène et détermination de relations parfaitement démontrables, sur le modèle de la réaction enzymatique ou de la réaction antigène-anticorps.

b) Reproductibilité des résultats - Intervalle de significativité

La reproductibilité de la méthode a été testée en faisant effectuer un grand nombre de fois, dans des conditions expérimentales parfaitement définies, l'agglutination d'une souche cellulaire donnée par un observateur travaillant en simple aveugle.

Deux personnes différentes ont ainsi testé trois souches cellulaires différentes six fois de suite. Les résultats sont reportés dans le tableau n° 6.

TABLEAU N° 6

SERIE	OBSERVATEUR	No	t	T	A	α
1	P.M.	1	2,5	30	2,8	2,9
		2	2,5	30	2,5	2,3
		3	4,0	30	3,0	3,4
		4	3,0	30	2,8	2,9
		5	2,5	30	2,8	2,9
		6	2,5	30	2,5	2,9
2	Y.B.	1	10	26	1,8	2,0
		2	10	26	2,0	2,5
		3	14	29	1,5	1,5
		4	10	27	2,0	2,5
		5	14	26	1,5	1,8
		6	12	26	1,8	2,5
3	P.M.	1	8	30	1,8	1,3
		2	9	30	2,0	1,4
		3	7	28	1,8	1,7
		4	9	28	1,8	1,6
		5	8	27	1,8	1,6
		6	8	30	2,0	1,4
	Y.B.	1'	7	28	1,8	1,7
		2'	7	28	1,8	1,7
		3'	9	28	1,8	1,6
		4'	8	30	1,8	1,3
		5'	8	27	1,8	1,6
		6'	9	30	2,0	1,4

APPRECIATION DE LA REPRODUCTIBILITE DES RESULTATS

L'analyse statistique de ces données est résumée dans le tableau nº 7. Nous voyons que l'écart-type maximum est de l'ordre de 2 pour les temps de latence, de 1,25 pour le temps T nécessaire pour atteindre le plateau et enfin de 0,1 sur la valeur du plateau lui-même. Ces différentes valeurs entraînent pour le coefficient d'agglutinabilité α qui en dérive une variance maximum de 0,16 et un écart type de l'ordre de 0,4.

Par ailleurs, nous pouvons remarquer qu'à aucun moment, le coefficient α ne s'écarte de la valeur moyenne de plus de 1,1 unité. Nous en déduisons que la valeur de α n'est connue qu'à une unité près et que seule une différence d'au-moins une unité entre deux valeurs peut être considérée comme significative. Cela entraîne que seule la partie entière de ce coefficient a une signification et qu'elle seule peut servir à comparer des souches.

TABLEAU Nº 7

SERIE		VALEURS EXTREMES	MOYENNE μ	ECART MAXIMUM	VARIANCE	ECART-TYPE
1	t	2,5-4,0	2,8	1,2	0,31	0,56
	T	30	30	0	0	0
	A	2,5-3,0	2,7	0,3	0,03	0,05
	α	2,3-3,4	2,8	0,6	0,11	0,33
2	t	10-14	11,7	2,3	3,23	1,8
	T	26-29	26,7	2,3	0,63	0,8
	A	1,5-2,0	1,8	0,3	0,43	0,66
	α	1,5-2,5	2,1	0,6	0,15	0,40
3	t	7-9	8,0	1,0	0,50	0,70
	T	27-30	29,0	1,0	1,50	1,25
	A	1,8-2,0	1,9	0,10	0,01	0,10
	α	1,3-1,7	1,5	0,20	0,02	0,15

ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES – INTERVALLE DE SIGNIFICATIVITE

c) Spécificité

Nous avons vu que la réaction d'agglutination était une réaction très sensible mais que cette grande sensibilité s'accompagnait parfois d'un manque de spécificité dû à la trop grande influence de facteurs purement physico-chimiques aspécifiques que nous avons développés.

La méthode que nous venons de décrire souffre certainement de ce même défaut. En particulier, l'agglutination des cellules trypsinées mérite d'être discutée de façon extrêmement sérieuse. La spécificité sera envisagée dans un chapitre de discussion générale.

ETUDE DE L'AGGLUTINABILITE CELLULAIRE AU COURS DU CYCLE DU VIRUS POLYOME

A – INTRODUCTION

B – ETUDE DE CELLULES TRANSFORMEES

C – ETUDE DU CYCLE ABORTIF DU VIRUS POLYOME

A – INTRODUCTION

En utilisant la méthode qui vient d'être décrite, nous avons étudié :

– Les modifications de surface d'un certain nombre de souches cellulaires transformées de façon stable par le virus polyome.

– La cinétique des modifications de surface survenant chez la cellule BHK 21/C13 au cours du cycle abortif du virus polyome.

Dans les deux cas, nous nous proposons de décrire brièvement les caractères du matériel utilisé et de donner les résultats numériques obtenus.

B – ETUDE DE CELLULES TRANSFORMEES PAR LE VIRUS POLYOME

I - MATERIEL

Nous avons testé l'agglutinabilité des souches cellulaires suivantes :

– CT 54 : Souche transplantable du hamster obtenue primitivement d'une tumeur induite par injection de 4×10^6 UFP de virus polyome chez le hamster nouveau-né et apparue au 30ème jour après l'inoculation. La DT 50 de cette souche chez le hamster est de l'ordre de 18×10^4 cellules. Elle est entretenue uniquement par passage in vivo d'animal à animal.

– ST 54 : Souche dérivée par clonage de la précédente. La DT 50 a été estimée par nous à 10^5 cellules environ. Cette souche parait, en culture, nettement plus transformée que la CT 54 dont elle est issue (croissance plus rapide, plus anarchique ; inhibition de contact moindre ; acidification plus rapide du milieu de culture).

– ST Py : provenant d'une tumeur obtenue dans le Service de Recherche du C.R.A.C.M. par L. PONS après injection à un hamster doré nouveau-né de 10^7 UFP de virus polyome. Mademoiselle PONS a ainsi obtenu en 56 jours une tumeur dont le passage in vivo a échoué. Des cellules provenant d'une primo-culture de cette tumeur injectées à la dose de 10^6 cellules par animal par voie sous-cutanée à des hamsters adultes ont donné des tumeurs transplantables en 3 semaines. Cette souche en est actuellement à sa 12ème transplantation. La DT 50 est de l'ordre de 10^3 à 10^4 cellules.

– 8 SPy/8 : clone de cellules BHK 21/C13 transformé in vitro par le virus polyome SP et cloné par Luc MONTAGNIER.

· SEWA : Primitivement sur ostéosarcome isolé en 1962 par SJÖGREN ; elle a été confiée au Laboratoire par Georges KLEIN (Karolinska Institute, Stockholm). Il s'agit

d'une souche tumorale ostéogénique de la souris, ASW, induite par le virus polyome chez le souriceau ASW nouveau-né et devenue secondairement ascitique. La DT 50 de cette souche n'a pas pu être déterminée ; elle est extrêment faible de l'ordre de quelques dizaines de cellules.

Nos témoins étaient constitués de cellules de rein de hamster normal isolées par trypsination et ayant subi 1 passage en culture, et de cellules BHK 21/C13 à leur 61ème subculture dans le laboratoire.

Toutes ces souches ont été cultivées dans des conditions très voisines. Elles ont été testées quand la densité de saturation de la culture a été proche de la confluence.

II - RESULTATS

Les résultats reportés ici sont constitués par la moyenne arithmétique d'au moins 5 tests d'agglutination. La variance du phénomène a été trop faible pour imposer une étude statistique plus poussée.

1) - La courbe d'agglutination

Les différents paramètres caractéristiques de chaque souche cellulaire sont reportés dans le tableau n° 8. Les courbes d'agglutination sont représentées sur les figures n° 11 et n° 12.

On obtient une famille de courbes s'étageant entre :

– La courbe représentative de l'agglutination des cellules de rein de hamster normales (cellules témoins), très aplatie, faisant apparaître un temps de latence très long (8 minutes) et un plateau bas situé (1) atteint en 18 minutes.

– Et la courbe représentative de la souche SEWA, présentant un temps de latence nul et un plateau d'agglutination élevé (4), atteint très rapidement en 10 minutes seulement.

Parallèlement, la pente P de la tangente à la courbe, passe de 0,40 pour les cellules témoins à la valeur de 4,0 pour les cellules de la souche SEWA.

2) - Le coefficient d'agglutinabilité

Les coefficients d'agglutinabilité, calculés selon la formule

$$\alpha = \frac{10\,A^2}{T + t}$$

sont reportés dans le tableau n° 8.

TABLEAU N°8

SOUCHE CELLULAIRE	A	T	t	P	α
CELLULES REIN HAMSTER NORMAL	1	18	8	0,40	0,4
BHK 21/C13	2	18	4	1,20	2
ST Py	4	25	2	1,40	5,9
8 SPy 8	4	18	1	1,8	8,4
CT 54	4	15	1	2,0	10
ST 54	4	14	0	2,40	11,4
SEWA	4	10	0	4,0	20

PARAMETRES CARACTERISTIQUES DES SOUCHES CELLULAIRES TESTEES

On voit que, d'une façon très concordante, les coefficients α sont respectivement de 0,4 et de 2 pour les cellules témoins et sont compris entre 5,9 et 20 pour les cellules transformées.

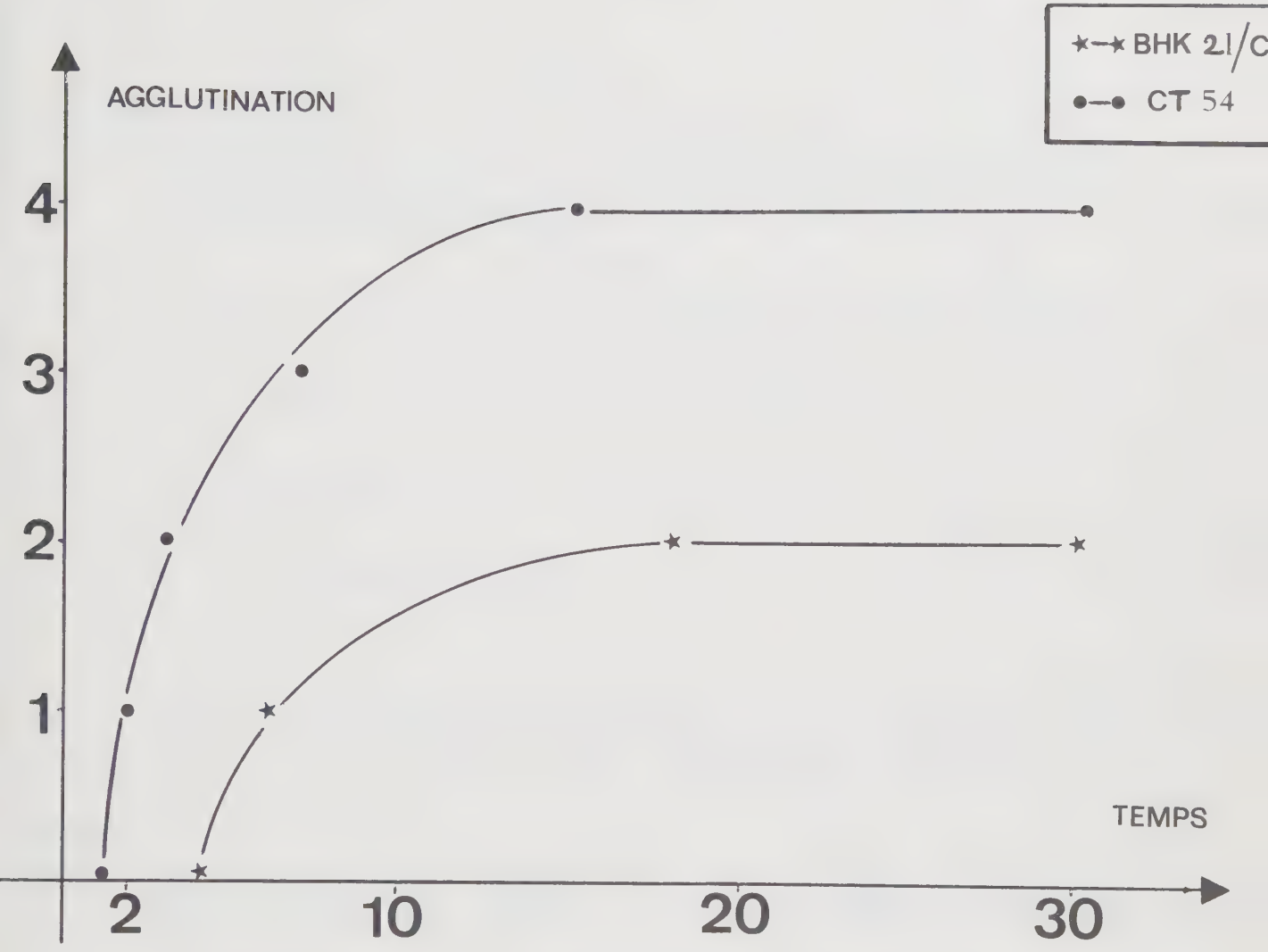


FIGURE n° 11

COURBE D'AGGLUTINATION DES SOUCHES BHK 21 ET CT 54

Les paramètres caractéristiques de ces souches sont respectivement :

	t	A	T	P	α
BHK 21	4	2	18	1,20	2
CT 54	1	4	15	2,0	10

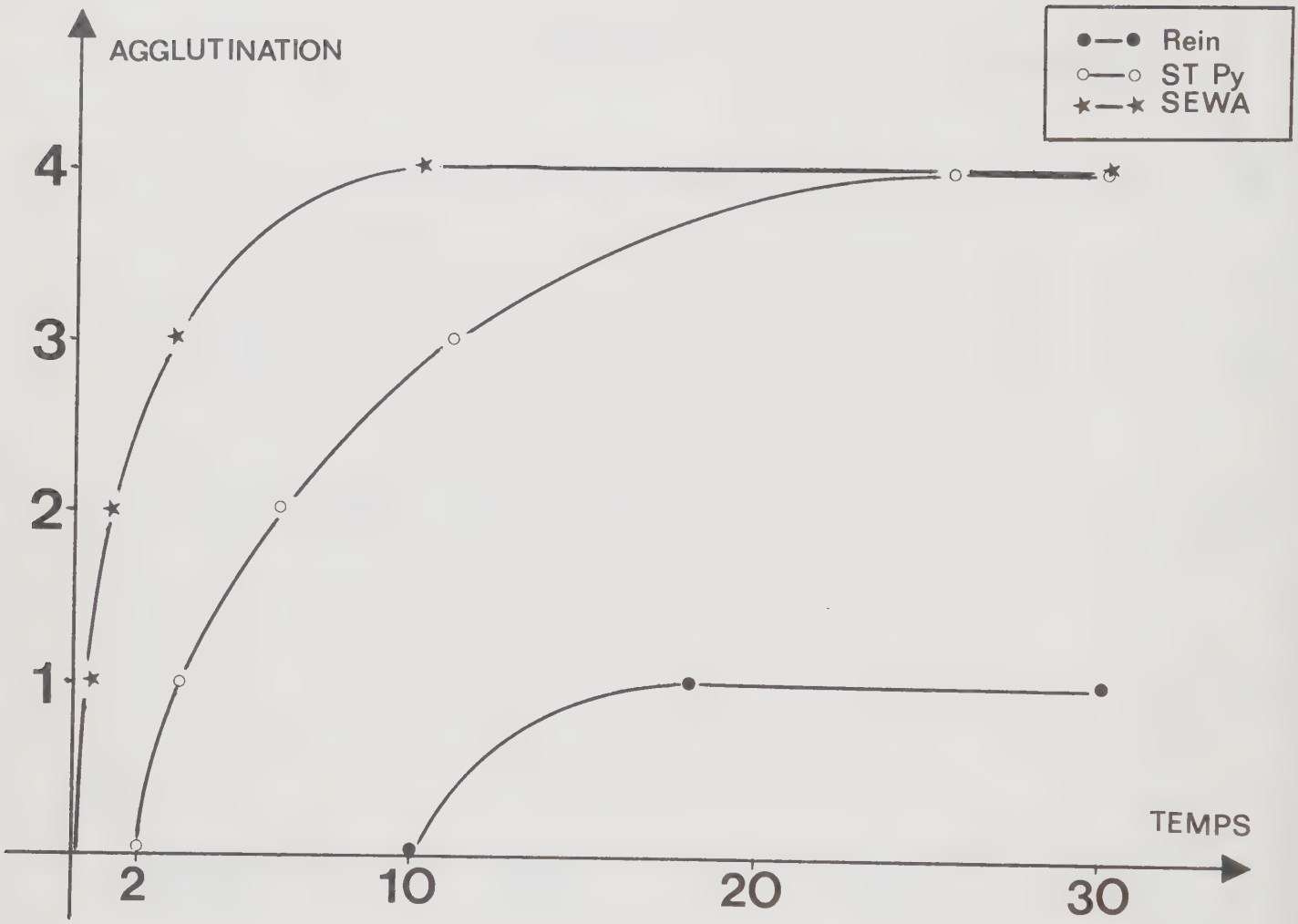


FIGURE n° 12

COURBE D'AGGLUTINATION DES SOUCHES SUIVANTES :

- Cellules de rein de Hamster normales

  Cellules ST Py

- Cellules SEWA ascite

3) - La détermination de l'unité agglutinante

Cette détermination n'a pu être faite que sur les cellules de la souche CT54 et BHK21, en raison de l'énorme quantité de cellules nécessaire pour la mise en oeuvre de cette technique. Les valeurs trouvées ont été respectivement de 27 μg pour la souche CT 54 et de 100 μg pour la souche BHK 21.

De même, le nombre de cellules nécessaire pour consommer complètement une quantité fixe de Concanavaline A (25 μg) est de 27 x 10^6 cellules pour la souche CT 54 et supérieur à 100 x 10^6 cellules pour la souche BHK 21.

Ces différents résultats seront discutés ultérieurement.

C – ETUDE DU CYCLE ABORTIF DU VIRUS POLYOME

I - MATERIEL ET METHODES

1) - Les cellules

Nous avons utilisé la souche BHK 21/C13 qui a été décrite précèdemment. Cette souche est subcultivée de façon courante dans le laboratoire de culture de tissus du C.R.A.C.M. Ses caractéristiques en culture sont maintenant parfaitement connues.

2) - Le virus

Nous avons employé la souche TORONTO, small plaque (SP) du virus polyome, clonée par BOURGAUX.

Le virus est produit sur cellules embryonnaires de souris. Le titrage est effectué par hémagglutination et par la méthode des plages.

3) - La production du cycle abortif

Pour chaque test, nous infectons 30 flacons (de 200 ml) de culture de cellules BHK 21/C13 en monocouche subconfluente par le virus polyome à la dose optima de 100 UFP par cellule.

Le contact est maintenu pendant 3 heures à 37°C, puis le milieu est renouvelé et la culture se poursuit, toujours à 37°C, pendant un temps déterminé dans du milieu de EAGLE MEM contenant 10% de tryptose phosphate et

– Soit 10% de sérum de veau : milieu dit "riche".

– Soit seulement 0,2 °/o de sérum de veau : milieu dit "pauvre".

Les cellules sont recueillies et testées toutes les 3 heures jusqu'à la 78ème heure après l'infection par le virus.

Les boites témoins (15 flacons de culture à chaque fois) sont traitées de la même façon mais reçoivent un extrait de cellules embryonnaires de souris non infectées à la place du virus.

4) - La production d'une vague de mitoses

Pour connaitre les facteurs dépendant directement du cycle mitotique et indépendants de l'infection virale, une division cellulaire est induite dans 30 boites de cellules BHK21/C13 non infectées cultivées en milieu "pauvre" à 0,2 °/o de sérum de veau par une supplémentation brusque en sérum dont la teneur passe à 10 °/o.

Nous avons également utilisé une méthode de synchronisation par le froid, les cellules étant laissées pendant 3 heures à + 4°C puis portées brusquement à 37°C.

Le nombre de cellules en division a été estimé :

– Par comptage des cellules en mitose après blocage de la division cellulaire par la technique classique à la colchicine.

– Par mesure de l'incorporation d'un précurseur radioactif (Thymidine Tritiée) au niveau du noyau par une méthode d'autohistoradiographie.

II - RESULTATS

Le cycle abortif a été étudié 5 fois en milieu riche et 4 fois en milieu pauvre. L'étude du cycle mitotique a été faite deux fois, en utilisant une première fois le froid comme agent synchronisateur et en comptant les mitoses après blocage colchicinique et une seconde fois en utilisant l'addition brusque de sérum de veau et l'incorporation de précurseur radioactif.

Les résultats étant plus dispersés que dans le cas précédent, une étude statistique plus fine des résultats a été nécessaire.

Pour chacune des heures testées, nous avons pratiqué un test d'agglutination complet, qui nous a permis :

– De construire la courbe d'agglutination et la tangente à la courbe.

– De déterminer les différents paramètres caractéristiques A, t, T et P.

– De calculer le coefficient α.

La courbe obtenue en portant en ordonnée le coefficient d'agglutinabilité α (dont les variations nous ont paru les plus significatives), et en abscisse le temps écoulé depuis l'infection par le virus représente l'évolution de notre système dans le temps, c'est à dire la cinétique des modifications de la surface cellulaire au cours du cycle abortif, telles qu'elles peuvent être mises en évidence par les lectines.

Les résultats sont différents selon que les cellules sont cultivées en milieu à 10 °/o de sérum de veau (milieu riche) ou en milieu avec seulement 0,2 °/o de sérum (milieu pauvre). Dans les deux cas, l'expérience n'a pu être poursuivie au delà de la 78ème heure après l'infection à cause du mauvais état des cultures cellulaires à partir de ce moment.

1) - Cycle Abortif en milieu riche

La figure n° 13 représente les courbes d'agglutination correspondant aux 12e, 36e, 48e, 52e et 72e heure après l'infection virale. Ces heures ont été choisies pour leur caractère représentatif de l'évolution globale du système.

On voit en effet que :

– A la 12e heure, la courbe est très aplatie, les paramètres sont A=2 ; t=4 ; T=16 et P=1,50

– A la 36e heure, la courbe est au contraire devenue très abrupte (A=4 ; t=0 ; T=8 ; P=4,0).

– A la 48e heure, la courbe s'est aplatie à nouveau (A=4 ; t=2 ; T=16 et P=2,0).

– A la 52e heure, on constate un nouveau redressement (A=4 ; t=1 ; T=10 ; et P=2,4).

– Enfin à la 72e heure, la courbe est redevenue plus basse (A=4 ; t=2 ; T=16 et P=2,0).

Les courbes représentatives de l'agglutination aux autres heures après l'infection s'intercalent de façon régulière entre celles qui sont données ici. Elles n'ont pas été reproduites pour éviter d'alourdir inutilement le shéma.

A partir de ces données, les valeurs du coefficient α ont été calculées pour chacune des heures. Les variations au cours du temps sont représentées dans le tableau n° 9.

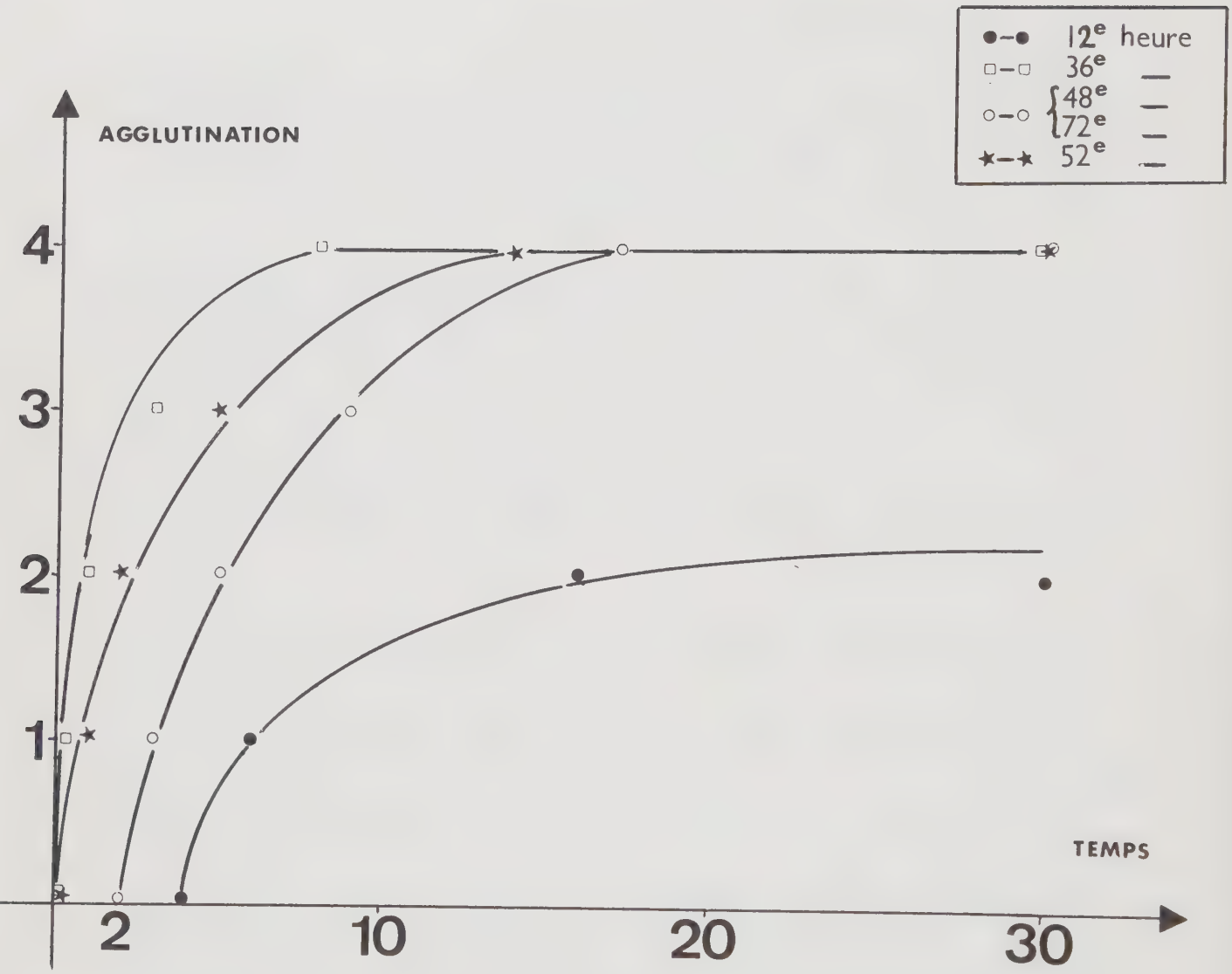


FIGURE n° 13

CYCLE ABORTIF EN MILIEU "RICHE" (à 10°/o de sérum de veau)

Représentation des courbes d'agglutination caractéristiques des modifications de surface aux 12e, 36e, 48e, 52e et 72ème heure après l'infection virale.

TABLEAU N°9

Heures après Infection	Valeurs extrêmes de α mesurées	Moyenne μ	Variance	Ecart-type
4e	1	1	0	0
12e	1,5 – 2,5	2	0,125	0,35
18e	3,5 – 4,5	4	0,125	0,35
24e	6 – 8	7	0,5	0,71
30e	10 – 11	10,5	0,125	0,35
33e	15	15	0	0
36e	19,5 – 20,5	20	0,125	0,35
39e	12,5 – 15,5	14	0,125	1,10
42e	12 – 13	12,50	0,125	0,35
48e	10,5	10,50	0	0
52e	15 – 17	16	0,5	0,71
60e	11,5 – 12,5	12	0,125	0,35
72e	9 – 11	10	0,5	0,71
78e	8,5 – 9,5	9	0,125	0,35

CYCLE ABORTIF EN MILIEU "RICHE"

VARIATIONS DU COEFFICIENT D'AGGLUTINABILITE

(moyenne de 5 expériences)

Après l'infection par le virus, nous obtenons une courbe diphasique régulière (figure n° 14) qui était déjà suggérée par les résultats précédents.

En effet :

– L'agglutinabilité apparait de façon précoce dès la 12e heure après l'infection ($\alpha = 2$).

– Elle augmente régulièrement et rapidement, et le coefficient α, passe de la valeur 4 à la 18e heure à 15 à la 33e heure.

FIGURE N° 14

VARIATIONS DU COEFFICIENT D'AGGLUTINABILITE DE LA CELLULE BHK 21/C 13 AU COURS DU CYCLE DU VIRUS POLYOME.

a - En milieu riche à 10 °/o de sérum de veau

b - En milieu pauvre à 0,2 °/o de sérum de veau

c - Effet de la mitose sur le coefficient d'agglutinabilité

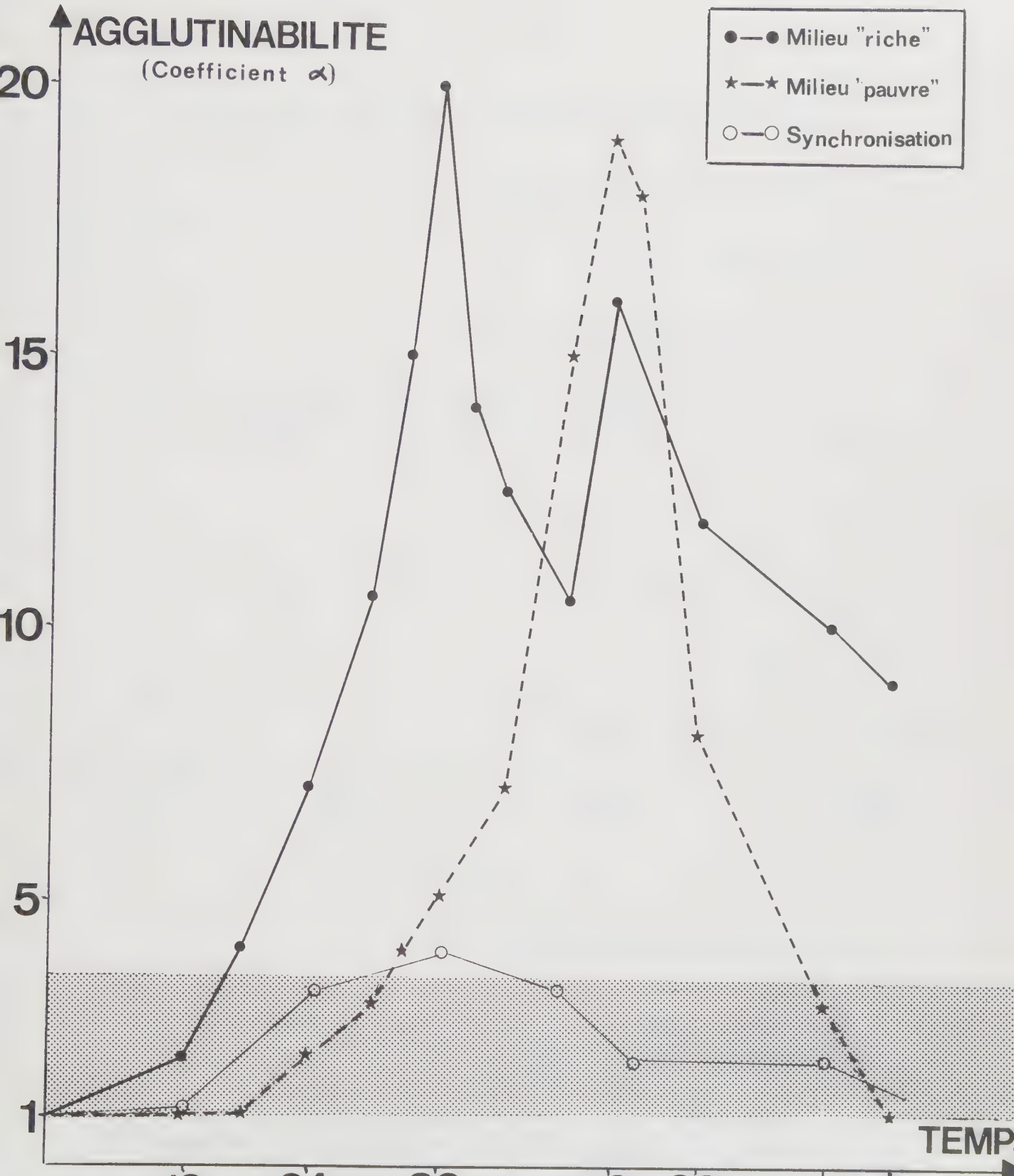

AGGLUTINABILITE
(Coefficient α)
20
15
10
5
1
Milieu "riche"
Milieu "pauvre"
Synchronisation
TEMP
12
24
36
52
60
78

FIGURE n° 14

– Elle présente un premier maximum à la 36e heure avec un pic d'agglutinabilité à 20.

– Elle redescend à la valeur 10 (48e heure).

– Pour présenter un second maximum de valeur plus faible que le premier ($\alpha = 16$) à la 52e heure.

– Et enfin décroitre de façon régulière mais très lente. A la 78e heure après l'infection, le coefficient d'agglutinabilité est à 9.

La variabilité du phénomène est appréciée de façon statistique dans le tableau n° 9. Les valeurs trouvées au cours des 5 expériences ne s'écartent jamais de la valeur moyenne de plus de 1,5, ce qui se traduit par une variance et un écart-type de l'ordre de l'unité au maximum.

2) - Le cycle abortif en milieu pauvre

La figure n° 15 représente les courbes d'agglutination correspondant dans ce cas aux 12e, 52e, et 72e heure après l'infection.

On constate que :

– A la 12e heure, la courbe est très aplatie, semblable à la courbe des cellules témoins (A=2 ; t=4 ; T=16 ; P=1,50).

– A la 52e heure, la courbe est au contraire très raide (A=4 ; t=0 ; T=9 ; P=4,0).

– A la 72e heure, elle est redevenue très basse (A=3 ; T=28 ; t=2 ; P=1,6).

Comme précédemment, le coefficient α a été calculé pour chacune des autres. Les variations sont résumées dans le tableau n° 10.

La courbe représentative de l'évolution du coefficient d'agglutinabilité (figure n° 14) présente un seul pic, ce qui la distingue fondamentalement de la cinétique obtenue en milieu riche. On voit en effet que :

– L'agglutinabilité n'apparait de façon évidente qu'à partir de la 30e heure après l'infection. Avant la 30e heure, le coefficient α reste au dessous de 3, dans la zone des variations non significatives.

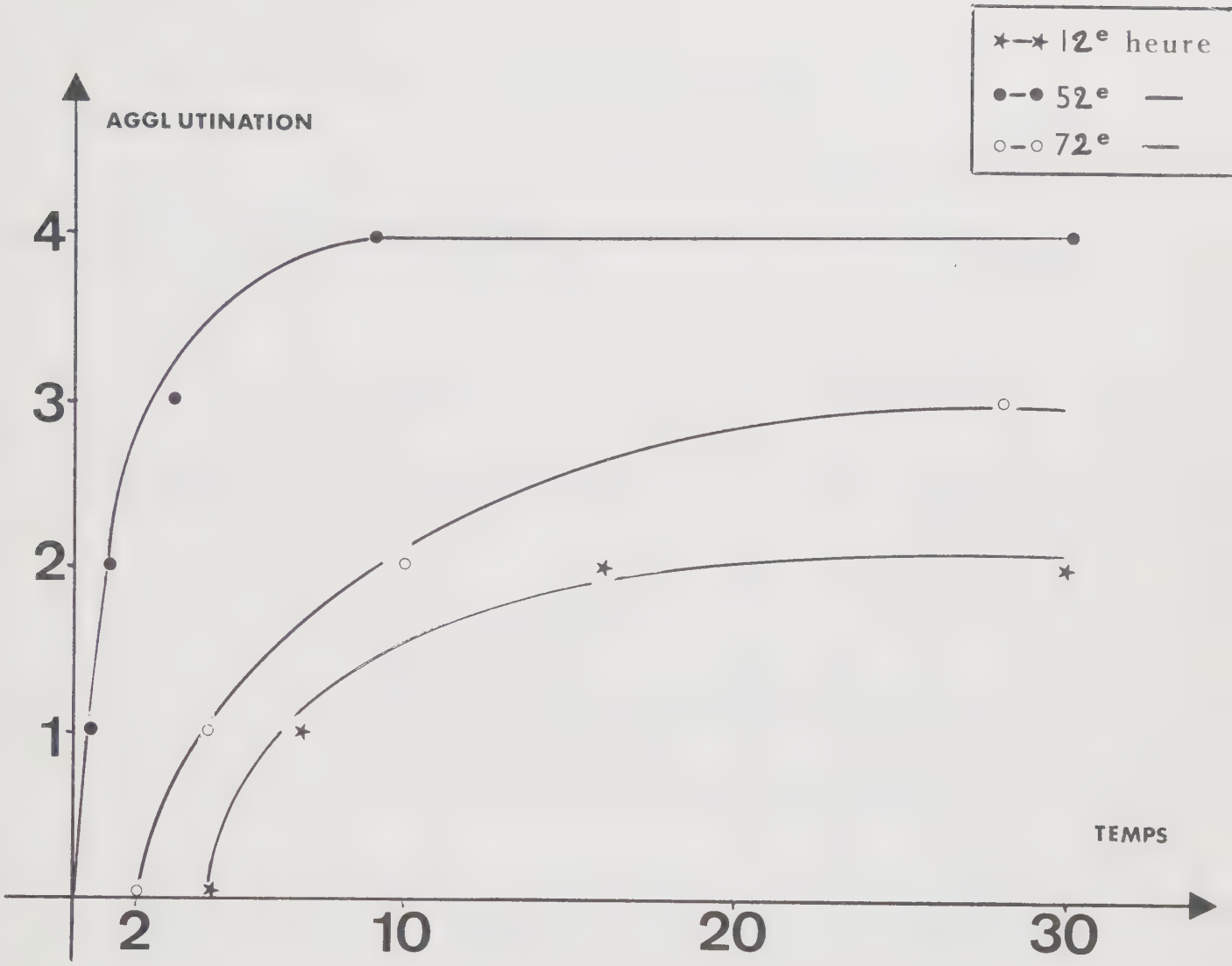


FIGURE n° 15

CYCLE ABORTIF EN MILIEU "PAUVRE" (à 0,2 °/o de sérum de veau)

Représentation des courbes d'agglutination caractéristiques des modifications de surface aux 12e, 52e, et 72ème heure après l'infection virale.

– Elle augmente d'abord de façon lente, α passant de la valeur 2 à la 24e heure à 7 à la 42e heure.

– Puis de façon beaucoup plus rapide.

– L'agglutinabilité présente un unique maximum de valeur élevée ($\alpha = 19$) situé à la 52e heure.

– Puis elle redescend de manière rapide et régulière entre la 54e et la 72e heure.

– Pour redevenir parfaitement normale à la 78e heure ($\alpha = 1$).

L'analyse statistique des résultats est reportée dans le tableau n° 10. Elle montre que, comme dans le cas de la cinétique en milieu riche, la variance et l'écart-type sont de l'ordre de l'unité.

3) - Etude de l'influence de la mitose sur l'agglutinabilité

Nous avons étudié l'agglutinabilité d'un lot cellulaire chez lequel une vague de mitoses avait été provoquée par les méthodes décrites plus haut.

D'une façon générale, le coefficient d'agglutinabilité parait relativement peu modifié par cette action (figure n° 14).

Après synchronisation, le coefficient reste à sa valeur de base ($\alpha = 1$) jusqu'à la 22e heure, puis croît de façon régulière, mais modérée jusqu'à la valeur 4 (atteinte à la 36e heure), pour redescendre enfin de manière lente à 2 à la 56e heure.

La signification de ce résultat sera discutée ultérieurement.

4) - Les témoins

Les différentes valeurs prises par le coefficient d'agglutinabilité des cellules BHK21 témoins (déterminées au cours de plus de 50 tests différents) ont permis de définir deux valeurs extrêmes du coefficient α pour les cellules témoins. La valeur minima est de 1, la valeur maxima observée est de 3,5. (figure n° 16).

Ces deux valeurs permettent de considérer une zone de variations non significatives de la souche BHK 21, à l'intérieur de laquelle l'agglutinabilité est considérée comme étant à sa valeur de base, sans tenir compte des données numériques vraies (figure n° 14).

TABLEAU N° 10

Heures après infection	Valeurs extrêmes de α mesurées	Moyenne μ	Variance	Ecart-type
4e	1	1	0	0
12e	1	1	0	0
18e	0,5 – 1,5	1	0,125	0,35
24e	2	2	0	0
30e	2 – 4	3	0,5	0,71
33e	3,5 – 4,5	4	0,125	0,35
36e	4 – 6	5	0,5	0,71
42e	5,5 – 8,5	7	1,125	1,1
48e	14 – 16	15	0,5	0,71
52e	18,5 – 19,5	19	0,125	0,35
54e	16,5 – 19,5	18	1,125	1,1
60e	7,5 – 8,5	8	0,125	0,35
72e	3	3	0	0
78e	0,5 – 1,5	1	0,125	0,35

CYCLE ABORTIF EN MILIEU "PAUVRE"

VARIATIONS DU COEFFICIENT D'AGGLUTINABILITE
(moyenne de 4 expériences)

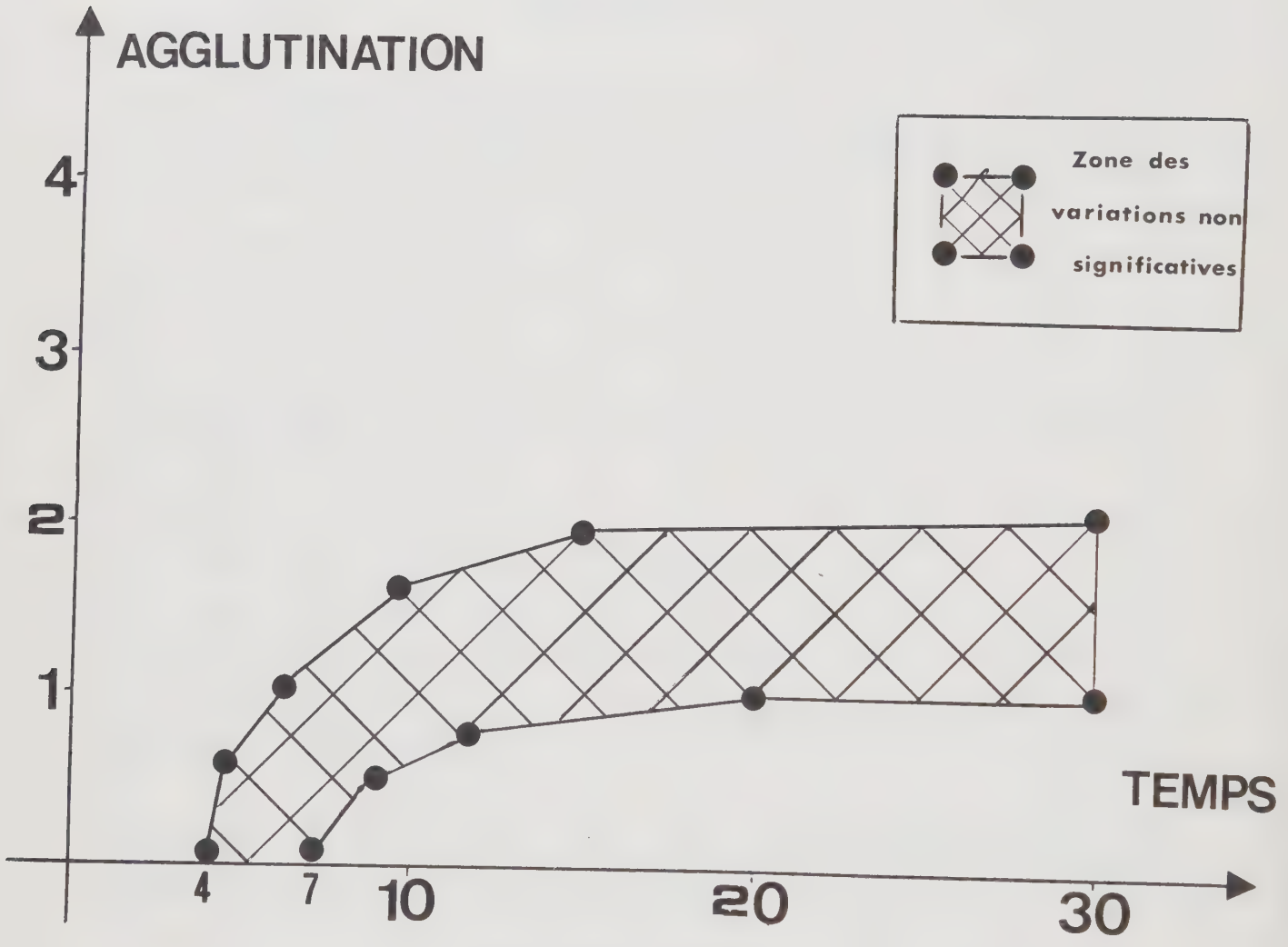


FIGURE n° 16

REPRESENTATION DE LA ZONE DES VARIATIONS SPONTANEES NON SIGNIFICATIVES DE LA CELLULE BHK 21/C 13 NON INFECTEE.

DISCUSSION

Dans ce chapitre, nous nous proposons de passer en revue les points qui nous paraissent spécialement importants et de les discuter. Nous serons ainsi amenés à envisager successivement :

– La méthode proposée, sa valeur et ses limites.

– Les théories explicatives du phénomène d'agglutination cellulaire par les lectines.

– La signification du coefficient α précédemment défini et la place qu'il convient de lui accorder parmi les autres tests utilisés en Cancérologie expérimentale.

– La spécificité du phénomène.

– Les résultats obtenus avec les cellules transformées et au cours du cycle abortif du virus polyome.

– Enfin, la place des modifications de surface révélées par la Concanavaline A au sein des multiples modifications de surface visibles au cours du cycle abortif du virus polyome.

A – DISCUSSION DE LA METHODE

Les inconvénients des méthodes d'agglutination décrites jusqu'à ce jour dans la littérature ont été passés en revue au chapitre consacré à la technique. Nous n'y reviendrons pas ici.

La méthode proposée, que nous avons mise au point et utilisée pendant plus d'un an au Service de Recherches du C.R.A.C.M., présente, elle aussi, des avantages et des inconvénients.

Ses avantages sont essentiellement représentés par :

– Sa grande simplicité, son coût peu élevé tant en matériel qu'en cellules, sa rapidité d'exécution.

– Sa sensibilité, et sa précision, très suffisantes semble-t-il pour tester n'importe quelle souche cellulaire de façon satisfaisante et directement exploitable.

– Sa fidélité : le caractère de reproductibilité a été étudié dans un chapitre précédent et parait suffisant.

– Son caractère de généralité, tant au point de vue du phénomène étudié dont elle permet de tirer le maximum de renseignements que vis à vis des différentes souches cellulaires.

– Le fait que, exprimant un résultat numérique, elle permet de comparer les résultats d'une façon simple et de tracer des courbes.

Ses inconvénients tiennent à plusieurs points :

– Le manque de spécificité sera longuement discuté dans un paragraphe ultérieur. Il tient à deux facteurs différents :

* A la grande influence des facteurs physico-chimiques aspécifiques surla réaction d'agglutination en général. Il faut noter que cet inconvénient peut être compensé par l'utilisation de techniques d'inhibition de l'agglutination.
* A l'absence de spécificité des sites vis à vis de l'agent transformant.

Cette absence de spécificité entraine un certain nombre de causes d'erreurs qui ont été passées en revue au chapitre de description. Elle exige une grande minutie dans l'exécution et une parfaite standardisation des paramètres intervenant de façon importante.

– La reproductibilité, parfaitement assurée quand la méthode est mise en oeuvre

par le même observateur ou par deux observateurs parfaitement d'accord, devient moindre quand la technique est réalisée par une personne mal entrainée. Cela tient au fait que les facteurs subjectifs d'appréciation n'ont pu encore être éliminés. Des expériences sont en cours, en particulier avec Y. BARRA pour essayer de réduire au maximum la part de subjectivité de l'expérimentateur.

– L'incapacité où nous sommes de nous livrer actuellement à une étude mathématique rigoureuse du phénomène, qui entraine un certain nombre d'approximations préjudiciables sinon à la technique elle même du moins à une véritable compréhension du phénomène, comme celle à laquelle on est arrivé en Biochimie pour la réaction enzymatique et en Immunologie pour la réaction antigène-anticorps.

Les améliorations possibles découlent de ce qui vient d'être dit. Elles doivent à notre avis porter surtout sur la limitation des facteurs subjectifs et vers une plus grande rigueur dans l'interprétation.

B – THEORIES EXPLICATIVES DE L'AGGLUTINABILITE

I - LES SITES DE SURFACE

De nombreux auteurs se sont interrogés sur le déterminisme de l'action préférentielle de la Concanavaline A sur les cellules embryonnaires, trypsinées et transformées. Les analogies entre ces trois sortes de systèmes cellulaires ne sont pas évidentes, ni les propriétés communes les distinguant toutes les trois de la cellule normale intacte.

D'une manière synthétique, on peut envisager trois types de modifications (figure n° 17) dans l'organisation structurale de la surface cellulaire pouvant expliquer l'aptitude à être agglutiné par les lectines (BURGER 1969 *(39)*).

1) - Il peut s'agir de la synthèse de novo de sites superficiels spécifiques de la Concanavaline A par la cellule. Dans cette hypothèse, les cellules normales ne possèdent pas du tout de sites spécifiques de surface, et la transformation maligne s'accompagne de la synthèse de ces sites qui se forment ainsi "de novo" (un virus oncogéne pouvant, par exemple, apporter le matériel génétique codant pour la synthèse de ces sites ou bien une action carcinogène physico-chimique pouvant modifier le matériel génétique cellulaire de telle façon que puissent s'exprimer des gènes normalement réprimés).(figure n° 17a).

Ce mécanisme semble pouvoir être exclu d'emblée puisque certaines cellules normales adultes sont agglutinées par de fortes concentrations en Concanavaline A, que les cellules embryonnaires sont agglutinées et que la trypsination de cellules parfaitement normales rend possible l'agglutination.

2) - On peut imaginer en seconde hypothèse une augmentation du nombre de sites. Dans ce cas, les cellules normales sont bien porteuses en surface de sites récepteurs de la Concanavaline A, mais leur nombre est insuffisant pour entrainer l'agglutination. (figure n° 17b).

La transformation, ici, ne "crée" pas les sites mais se contente de modifier les mécanismes de régulation de leur synthèse de telle façon que leur nombre total augmente à la surface de la cellule transformée.

Cette hypothèse semble pouvoir expliquer de façon satisfaisante l'agglutination de cellules normales en présence de très hautes concentrations en Concanavaline A, la faible quantité de sites étant dans une certaine mesure compensée par la grande quantité de lectine. Elle ne rend pas compte, cependant, du fait que les cellules normales peuvent acquérir la même agglutinabilité que les cellules transformées lors de la trypsination, et ce, tant d'un point de vue qualitatif que quantitatif.

3) - Enfin, il peut s'agir d'un réarrangement de la structure de la surface cellulaire, laissant intact le nombre absolu de sites superficiels. La transformation se comporterait dans ce cas comme un traitement protéolytique vis à vis de la cellule normale.(figure n° 17c).

Cette dernière hypothèse permet d'expliquer un maximum de faits expérimentaux et est, de fait, la plus séduisante du point de vue de la Biologie moléculaire. Elle a été reprise et précisée par un certain nombre d'équipes et en particulier par BEN BASSAT et coll. (1971 *(25)*). Selon ces auteurs, ce réarrangement de la surface cellulaire peut lui-même être envisagé sous trois aspects principaux.(figure n° 17).

a) Les sites pourraient être parfaitement présents à la surface cellulaire ou à proximité immédiate, de celle-ci, mais sous une forme cryptique et inactive car non accessible aux molécules de Concanavaline A. Cette conception est suggérée par l'action de la digestion protéolytique ménagée qui semble "décaper" la surface cellulaire et révéler ainsi des sites "latents" au niveau de la cellule normale intacte. Ce shéma est bien connu et prouvé en Immuno-Hématologie où l'on sait que la destruction ménagée de la surface des hématies révèle des spécificités antigéniques qui n'apparaissaient pas à la surface des cellules intactes. (figure n° 17c).

Cependant, les cellules de hamster BHK 21 transformées par le virus polyome et les cellules de souris 3T3 transformées par le virus SV40 fixent la même quantité de Concanavaline A marquée par le tritium que les cellules BHK 21 et 3T3 normales non infectées (OZANNE et SAMBROOCK 1971 *(198)*). De plus, ARNDT-JOVIN et BERG (1971 *(11)*) ont démontré en utilisant de la Concanavaline A marquée à l'iode 125 que ces cellules présentent la même affinité pour la lectine et en fixent la même quantité qu'elles soient normales, trypsinées ou viro-transformées. Il concluent que la capacité d'être agglutinées de façon différente par les lectines ne résulte pas de différences dans le

FIGURE N°17

THEORIES EXPLICATIVES DE L'AGGLUTINABILITE CELLULAIRE PAR LES LECTINES.

a - Synthèse de sites "de novo"

b - Augmentation du nombres de sites

c - Exposition de sites cryptiques

d - Augmentation de la densité des sites par diminution de la taille cellulaire

e et e' - Réarrangement des sites de surface

FIGURE n° 17

FIGURE N° 18.

FIXATION DE LA CONCANAVALINE A SUR LA SURFACE DE CELLULES NORMALES ET DE CELLULES TRANSFORMEES.

La technique utilisée consiste à incuber le tapis cellulaire intact (non fixé) avec une solution de Concanavaline A, à la concentration de 200 micro-grammes par ml pendant 30 mn ; puis, après rinçage, avec une solution de peroxydase pendant 30 mn. La réaction enzymatique est révélée par la 3-3'-diamino-benzidine en présence d'eau oxygénée.

Les sites ayant fixé la Concanavaline A apparaissent comme des amas foncés opaques aux électrons.

On ne peut noter aucune différence significative entre la fixation à la surface des cellules transformées (souche CT54 : photos a, b, et c) et la fixation à la surface des cellules BHK 21 normales (photo d).

Clichés effectués par C. de MICCO-PAGIS dans le Service de Microscopie électronique du CRACM.

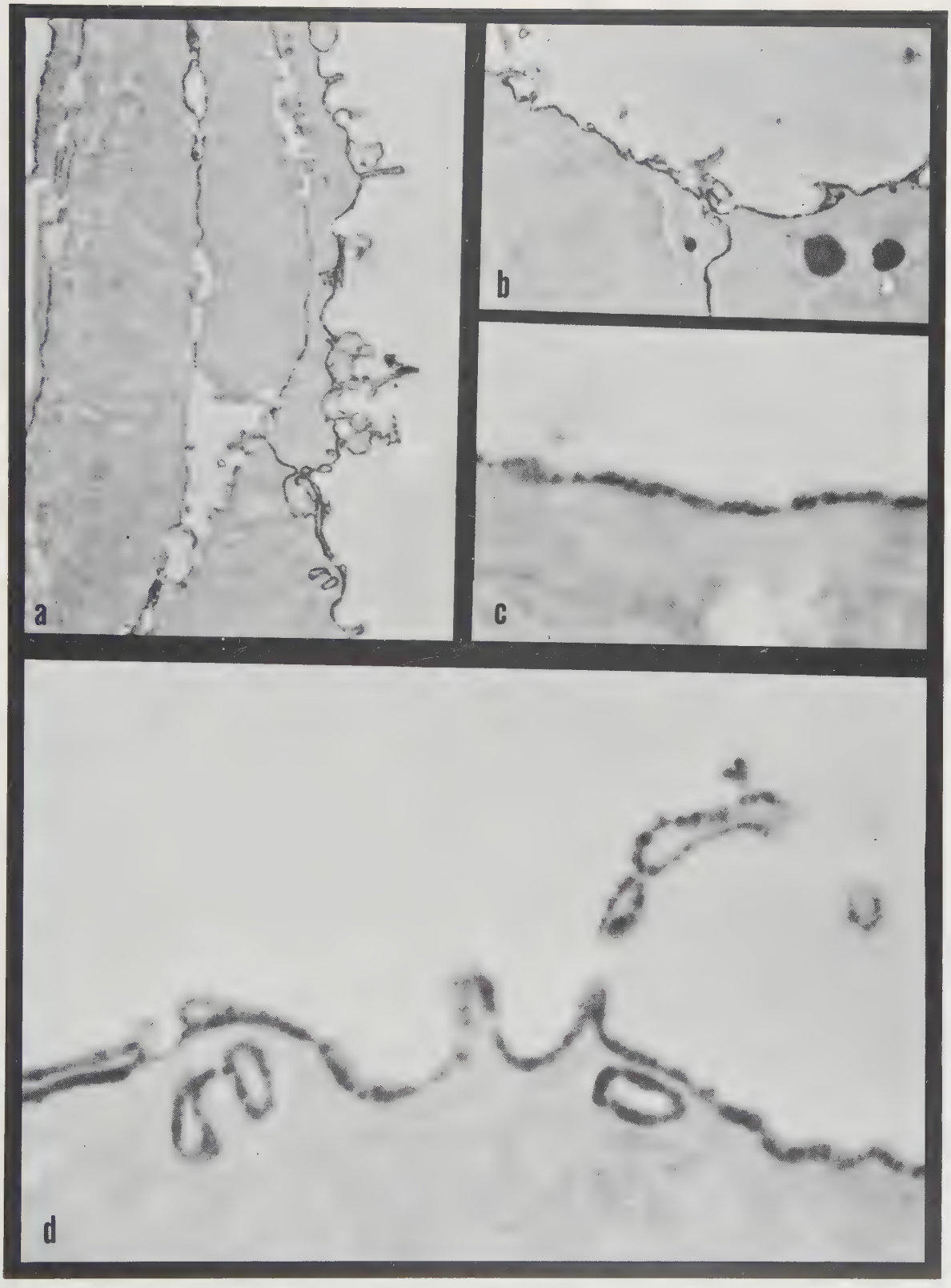


Figure N°18

nombre de sites de fixation entre la surface des trois types de cellules. Ces faits ont été confirmés au Centre de Lutte contre le Cancer de Marseille par C. DE MICCO-PAGIS (1971) (communication personnelle) (figure n° 18) qui, en utilisant la technique de révélation par la peroxydase n'a jamais pu mettre en évidence de différence de marquage significative entre les cellules normales et les cellules transformées.

b) La seconde hypothèse faite par BEN BASSAT est que la surface cellulaire tout entière, et les sites portés par cette surface en particulier, ne subissent pas de changements notables propres, ni en ce qui concerne leur structure ou leur état ni en ce qui concerne leur nombre, mais qu'une diminution de la taille cellulaire consécutive à la transformation entraine une augmentation relative des sites à la surface par rapport à la cellule normale (figure n° 17d). Des expériences effectuées avec des cellules de hamster ont montré, en effet, que la transformation par le virus SV40 provoque une diminution de la taille cellulaire de l'ordre de 30 à 50 °/o, variable avec les conditions de culture. Ce changement de taille cellulaire ne s'accompagne pas d'une diminution de la quantité de protéine par cellule. Ces données confirment celles dont font état INBAR et SACHS (1969 *(138)*). La surface cellulaire variant comme le carré des dimensions linéaires, une modification de diamètre de cette importance entraine une énorme diminution de la surface de la cellule et la densité des sites peut devenir suffisante pour permettre l'agglutination des cellules ainsi réduites.

e) Enfin, une augmentation de la densité des sites superficiels peut également être dûe, en dehors de toute modification du nombre total de sites et de la taille des cellules, à un réarrangement des sites fixant la Concanavaline A à la surface (figure n° 17e et e'). Ce réarrangement peut être conçu comme une redistribution dans l'espace, avec concentration en certains points de la surface de la cellule transformée, de sites en général régulièrement dispersés sur toute la surface de la cellule normale dont elle est issue. Ce phénomène a été visualisé en microscopie électronique par NICOLSON (1971 *(186)*) qui a montré, en utilisant la Concanavaline A marquée à la ferritine que les sites étaient répartis d'une manière homogène sur la surface des cellules BHK 21 et 3T3 normales et qu'ils étaient au contraire groupés en amas très denses à certains endroits de la surface de ces mêmes cellules transformées par des virus à ADN.

Ce réarrangement peut également être conçu en termes plus biochimiques.

INBAR et coll. (1971 *(134)*) ont montré que les cellules transformées et les cellules normales traitées par la trypsine sont agglutinées aussi bien à 24°C qu'à 4°C à condition d'utiliser de hautes concentrations en Concanavaline A (supérieure à 500 μg par ml), mais seulement à 24°C en présence de basses concentrations (5 μg par ml). De plus, l'agglutination par la Concanavaline A des cellules transformées qui n'ont pas été traitées par la trypsine est réversiblement inhibée par un passage de la température de 24°C à 4°C. Cette inhibition de l'agglutination à 4°C est bien due à une action sur

l'agglutinabilité et non à une diminution de la fixation de la Concanavaline A puisqu'un nombre égal de molécules est fixé aux deux températures. La quantité de lectine qui s'unit au glycogène est aussi la même quelle que soit la température. Ces données sont résumées dans le tableau suivant :

CELLULES	4°C		24°C	
	HAUTE CONCENTRATION	BASSE CONCENTRATION	HAUTE CONCENTRATION	BASSE CONCENTRATION
NORMALES	—	—	—	—
TRYPSINEES	+	0	+	0
TRANSFORMEES	—	—	+	+

Ces résultats suggèrent que le site cellulaire spécifique de l'interaction avec la Concanavaline A est en fait complexe, comportant (figure n° 19a).

– Un motif B, présent aussi bien sur les cellules normales que sur les cellules transformées, non thermodépendant, responsable de la fixation de la protéine sur la surface cellulaire.

– Et un motif A, thermodépendant puisqu'il n'est actif qu'à 24° C, qui détermine l'agglutination. Ce motif A n'est fonctionnel que sur les cellules transformées. Il peut être activé par la trypsine et cette activation permet l'agglutination en présence de faibles concentrations. Cette activité A thermodépendante est parfaitement spécifique de la Concanavaline A puisque les sites fixant l'agglutinine du germe de blé et ceux fixant l'agglutinine tirée du soja sont actifs quelle que soit la température. Ce site A semble être associé à une activité métabolique, très probablement enzymatique, active seulement à la surface des cellules transformées, et activable par trypsine. De plus, une ou deux divisions cellulaires sont nécessaires à l'expression du site A après la mise en culture (BEN BASSAT et coll. 1970 ; BURGER et coll. 1971 *(24,43)*). C'est ainsi que les cellules de hamster transformées ne sont pas agglutinables 24 heures après la mise en culture mais le sont au 4ème jour.

Ainsi, il existe à la surface des cellules ayant subi une transformation maligne des sites "A", associés à une activité enzymatique, thermodépendante puisque active seulement à 24°C, et responsable de l'agglutination par la Concanavaline A. Elle est de plus spécifique de cette lectine.

Ces faits paraissent donc justifier l'analogie que nous avons faite entre la réaction enzyme substrat et la réaction d'agglutination, par la Concanavaline A et permettent d'utiliser un formalisme mathématique commun.

Les rapports existant entre les sites responsables de l'activité spécifique de la Concanavaline A et les autres sites de la surface cellulaire sont encore mal connus. En particulier on ne connait pas les rapports qui existent entre les sites d'agglutination et les sites antigéniques néo-formés, type antigène S et antigène de FORSSMAN, qui apparaissent à la suite d'une transformation viro-induite. (BURGER 1971 ; MEYER et coll. 1971 *(40,175)*).

On commence à mieux connaitre, par contre, les rapports entre les sites d'agglutination et les sites de transport de certaines molécules à travers la membrane cellulaire.

La Concanavaline A, en effet, a un effet différent sur le transfert actif des acides aminés et des sucres au niveau de la membrane plasmique selon qu'elle agit sur une cellule normale ou sur une cellule transformée. (INBAR et coll. 1971*(133)*). Le transport du D-glucose et du D-galactose est inhibé par la fixation de la Concanavaline A aussi bien chez les cellules normales que chez les cellules transformées. Dans les deux types de cellules, le transfert du glucose est plus inhibé que celui du galactose. Cet effet parait parfaitement spécifique, et la Concanavaline A est sans action sur le transport du L-fucose. Ces résultats indiquent que, dans les cellules normales, les sites interagissant avec la Concanavaline A sont étroitement associés aux sites de transport du D-glucose et, à un degré moindre, à ceux du D-galactose. Dans les cellules transformées, ils sont de plus associés aux sites de transport des acides aminés et l'association avec les sites de transport des sucres est plus étroite. (figure n° 19b).

Ainsi, il semble maintenant démontré que la transformation cellulaire s'accompagne de modifications dans la localisation des sites de transport des sucres et des acides aminés, en relation avec les modifications intervenant au niveau des sites fixant la Concanavaline A. Ces modifications structurales sont certainement à rapprocher des modifications métaboliques de tous ordres que l'on constate au niveau des cellules transformées. Ces constatations etayent la théorie faisant jouer un rôle primordial à la surface cellulaire dans le déterminisme de la transformation maligne, celle-ci étant contemporaine de modifications dans la perméabilité de la membrane à certains métabolites et à certaines substances régulatrices (PARDEE 1964 (*199*)).

II - NOMBRE DE SITES

Le nombre de sites fixant la Concanavaline A à la surface cellulaire est l'objet de nombreuses controverses.

INBAR et SACHS donnaient (1969 *(136,137,138)*) une valeur s'étageant entre 8×10^3 à 58×10^3 sites par micron-carré selon la souche considérée.

FIGURE N° 19

ASPECTS BIOCHIMIQUES DES SITES DE SURFACE RESPONSABLES DES INTERACTIONS AVEC LA CONCANAVALINE A.

a - Existence de deux motifs différents au sein de chaque site. Le motif B est responsable de la fixation de la Concanavaline A sur la surface cellulaire. Le motif A est responsable de l'agglutination.

b - Rapports du site fixant la Concanavaline A avec les sites de transport des sucres et des acides aminés. Différence entre les cellules normales et les cellules transformées.

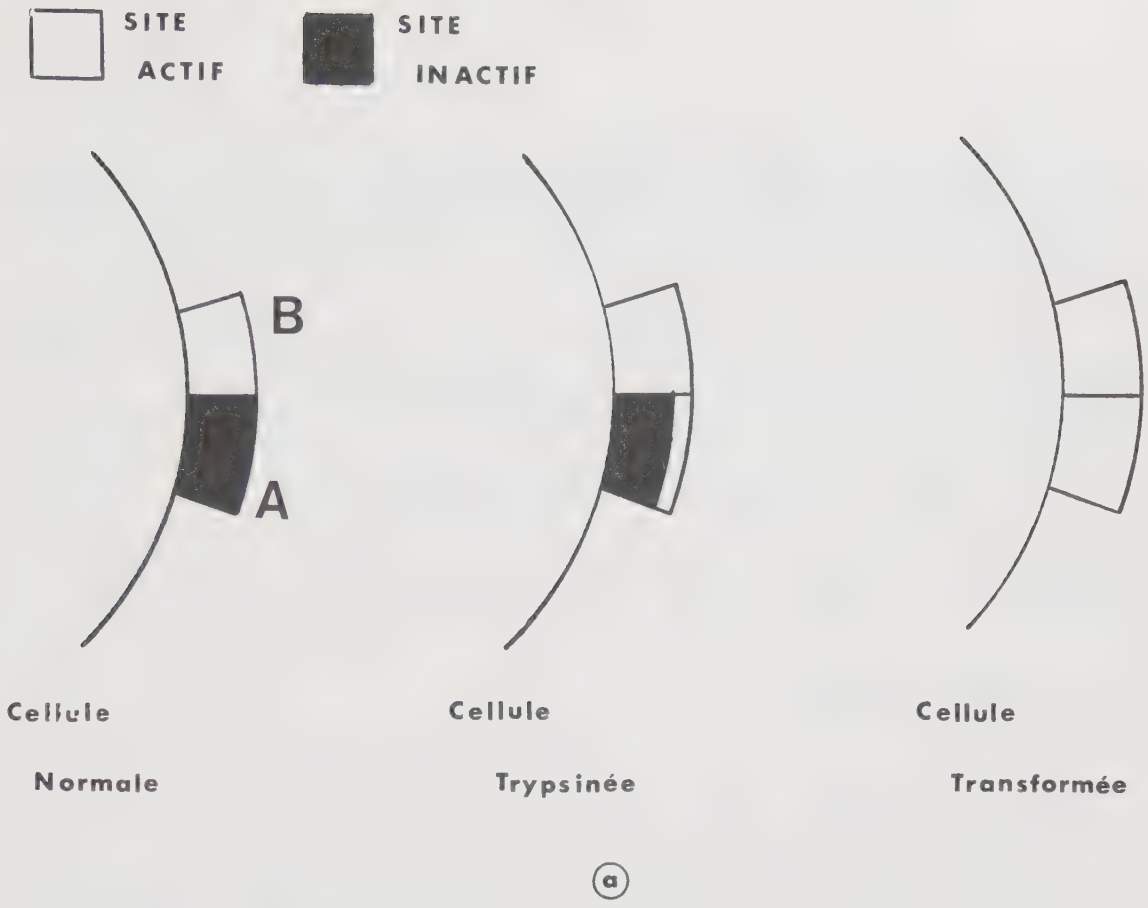

SITE ACTIF
SITE INACTIF
B
A
Cellule Normale
Cellule Trypsinée
Cellule Transformée
a
L-FUCOSE
D-GALACTOSE
D-GLUCOSE
CONCANALINE A
AMINO-ACIDES
Cellule normale
Cellule transformée

FIGURE n°19 b

OZANNE et SAMBROOCK (1971 *(198)*) trouvent 10^7 sites par cellule 3T3 transformée par le virus SV40 et NOVOGRODSKY et KATCHALSKI (1971 *(189)*) démontrent que les lymphocytes de rat portent en moyenne $3,3 \times 10^6$ sites par micron-carré.

FRIBERG et coll. (à paraitre) démontrent que la surface cellulaire porte 7×10^3 à 15×10^3 sites par micron-carré et nous avons confirmé ce fait (BARRA et coll. 1972) en montrant que les cellules de la souche CT 54 portent $12 \pm 2 \times 10^3$ sites par micron-carré.

Ces résultats confirment ceux de BEN BASSAT et coll. (1971 *(25)*) qui montraient que, chaque molécule de Concanavaline A ayant environ 40 Å de diamètre, 14 % de la surface cellulaire devaient être occupés par cette protéine quand tous les sites avaient réagi.

III - NATURE DES SITES

La nature des sites de surface fixant la Concanavaline A est actuellement très étudiée.

ALLAN et coll. (1972 *(9)*) ont réussi à purifier partiellement les motifs moléculaires récepteurs, par une technique chromatographique inspirée du principe des immuno-adsorbants. Leur matériel est constitué par des membranes de lymphocytes de porc, dissociées de façon douce par une solution de déoxycholate de sodium. Cette préparation est passée dans une colonne de SEPHAROSE sur laquelle ont été préalablement fixées des molécules de Concanavaline A. Les sites spécifiques restent accrochés à la colonne et sont ensuite élués par une solution d'α -méthyl-D-glucose. Cinq fractions glycoprotéiques peuvent ainsi être isolées et séparées sur gel de polyacrylamide. Deux de ces glycoprotéines ont un poids moléculaire de 27×10^3 et de 33×10^3 ; les 3 autres ont un poids moléculaire de l'ordre de 150×10^3. Ces différentes fractions inhibent la transformation des lymphocytes par la Concanavaline A.

IV - DETERMINISME GENETIQUE

Le déterminisme génétique des modifications de surface permettant l'agglutination est évidemment très intéressant à étudier mais il reste très peu connu. Les cellules qui perdent par mutation reverse les propriétés caractéristiques de la transformation perdent en même temps la capacité d'être agglutinées par la Concanavaline A (INBAR et coll. 1969 *(135)*). Les cellules ayant subi cette mutation reverse ont d'ailleurs une garniture chromosomique différente de celle des cellules transformées dont elles dérivent (RABINOWITZ et SACHS 1970 *(211)*). Elles possèdent un plus grand nombre de chromosomes et ces chromosomes sont en moyenne de plus grandes dimensions que ceux des cellules normales (HITOTSUMACHI et coll. 1971 *(130)*).

Nous avons nous même montré (BEREBBI et coll. 1972 *(29)* ; DE MICCO et BEREBBI à paraitre), que les variations d'agglutinabilité de plusieurs souches cellulaires différentes évoluaient parallèlement à certaines modifications cytogénétiques au niveau du caryotype. En particulier, dans un système hybride de cellules de hamster chinois, nous avons pu mettre en évidence un parallélisme très significatif entre la perte de certains chromosomes marqueurs et une augmentation de l'agglutinabilité cellulaire.

De même dans un système de cellules hybrides de souris les unes transformées par le virus polyome, les autres normales, les cellules ayant gardé leur pouvoir tumorigène étaient agglutinables, celles l'ayant perdu avaient perdu en parallèle leur réactivité vis à vis de la Concanavaline A (BEREBBI et MEYER en préparation).

C – LE COEFFICIENT D'AGGLUTINABILITE : SA SIGNIFICATION, SA PLACE PARMI LES AUTRES TESTS DE TRANSFORMATION

Nous avons vu que, sur le plan mathématique, le coefficient d'agglutinabilité α avait les dimensions d'une vitesse de réaction.

D'un point de vue biologique, le coefficient α présente, selon la théorie fondamentale à laquelle on se rallie, soit un nombre de sites de surface, soit un arrangement dans l'espace particulier, soit "l'activité" de l'enzyme déterminant la présence du site de surface responsable de l'agglutination.

Dans tous les cas, et sans permettre de trancher entre les diverses explications possibles, il rend compte de façon suffisante de la capacité d'un lot cellulaire donné, dans un état donné, à agglutiner en présence de Concanavaline A.

Il nous a semblé intéressant de confronter la valeur du coefficient α à un certain nombre d'autres paramètres de la transformation. En particulier nous avons étudié un système cellulaire hybride de hamster chinois spontanément transformé in vitro dont les caractéristiques (tumorigénicité, rendement en colonies en gélose semi-molle, densité de saturation, caryotype) nous étaient bien connus (DE MICCO et MEYER 1971 ; BEREBBI et coll. 1972 *(179,29)*). D'une manière synthétique, nous pouvons dire que, à de rares exceptions près, les valeurs de α et de P évoluent d'une manière tout à fait parallèle à la valeur des autres critères. Ainsi, les souches les plus transformées qui ont un rendement en colonies en gélose important et une forte densité de saturation in vitro (faible inhibition de contact), et une très forte tumorigénicité chez l'animal (DT 50 très basse) présentent concomittament une forte pente P et un fort coefficient α. Le test final de tumorigénicité reste évidemment le nombre de cellules nécessaire pour induire une tumeur dans un hôte syngénique, mais ce test n'est pas toujours praticable, en particulier et par définition, quand il s'agit de cellules constituées d'hybrides somatiques interspécifiques. Le test que nous venons de décrire prend là toute sa valeur.

Certaines souches cellulaires transformées, cependant, ne sont pas agglutinées, même en présence de très hautes doses de lectine. Ainsi, le carcinome TA 3 – NS n'est pas agglutiné même par des concentrations en Concanavaline A dépassant 1,6 mg par ml (FRIBERG et coll. 1971 *(91)*). De même, certaines cellules 3T3 de souris transformées par le virus SV40 (OZANNE et SAMBROOCK 1971 *(197)*). De telles exceptions sont rares ; très peu de cas ont jusqu'à présent été décrits. Il faut cependant en tenir compte, en particulier en cas de discordance entre les résultats d'un test de transformation et d'un autre. Pour notre part, nous n'avons jamais eu à résoudre de problème de cet ordre au cours de notre expérimentation, les résultats des différents tests ayant toujours concordé de façon très satisfaisante.

D – LA SPECIFICITE DU PHENOMENE

I - SPECIFICITE PAR RAPPORT A LA METHODE

La spécificité de la méthode utilisée a été envisagée dans un chapitre spécial.

Nous dirons seulement ici que la grande sensibilité de cette technique à des facteurs physico-chimiques divers et nombreux limite sa spécificité.

II - SPECIFICITE PAR RAPPORT A LA SOUCHE CELLULAIRE

L'étude de la reproductibilité des résultats effectuée un grand nombre de fois sur trois lots cellulaires d'origine différente nous a montré l'homogénéité des réponses d'une souche cellulaire donnée cultivée dans des conditions identiques. Cette dernière condition doit cependant être respectée de façon scrupuleuse car elle intervient de façon très importante dans l'importance de l'agglutinabilité. Quand elle est remplie, le coefficient d'agglutinabilité α d'un clone cellulaire homogène varie de façon tout à fait négligeable au cours du temps.

Ainsi, la souche BHK21/C13 qui est cultivée dans des conditions parfaitement définies et toujours par la même personne a toujours eu un coefficient α, compris entre 1 et 3,5 et cela sur plus de 50 tests répartis sur plus d'un an. De même, la souche CT54, qui nous sert fréquemment de témoin positif, a, depuis que nous la testons, un coefficient α, de l'ordre de 10 avec des paramètres d'agglutination stables ($A = 4 \pm 0$; $T = 15 \pm 2$; $t = 1 \pm 1$; $P = 0{,}2 \pm 0{,}05$).

La capacité d'agglutiner en présence de Concanavaline A représente donc une caractéristique stable et relativement constante pour une souche cellulaire donnée et nous pouvons en conclure que, en règle générale, il existe une bonne spécificité du phénomène vis à vis de la cellule.

Le seul problème, nous semble-t-il, pourrait venir d'une transformation ou d'une sur-transformation spontanée in vitro, ou en apparence spontanée (action virale latente incontrôlée) voire d'une action virale non transformante (virus quelconque) ou biochimique (enzymes protéolytiques) agissant à notre insu sur une souche cellulaire jusque là stable et bien connue. Une bonne connaissance des lignées cellulaires utilisées (morphologie) et l'emploi d'autres méthodes (détermination de la DT50) devraient permettre de pallier à cet inconvénient potentiel.

III - SPECIFICITE PAR RAPPORT AU CYCLE MITOTIQUE

Certains auteurs ont attiré l'attention sur le fait que la mitose pouvait dévoiler des sites de surface spécifiques des lectines (FOX et coll. 1971 *(90)*).

Nous avons étudié l'influence du phénomène mitotique sur l'agglutinabilité cellulaire en induisant une vague de divisions cellulaires par le passage + 4°C à 37°C ou par une supplémentation brusque de la culture en sérum et en testant l'agglutinabilité à différents temps après la synchronisation. Par ces méthodes, toutes les cellules n'entrent pas en mitose en même temps, mais un suffisamment grand nombre de cellules (10 à 50 °/o) se divisent au même moment pour que les effets de la mitose puissent être ressentis de façon notable et mesurés par la technique que nous utilisons.

Les résultats sont reportés dans la figure n° 14, qui montrent que l'aptitude à agglutiner liée au seul phénomène mitotique reste toujours très faible et négligeable par rapport aux variations viro-induites. Le coefficient α modifié par la seule mitose ne sort de la zone des variations non significatives que de façon très partielle et très peu importante (α égal à 4 à la 36e heure après l'induction de la mitose).

Il semble donc que ce qui a été décrit pour d'autres lectines que la Concanavaline A, avec d'autres procédés d'investigation ne se produise pas avec la Concanavaline A, la cellule BHK21 et la technique que nous utilisons. Dans ce cas, le cycle mitotique ne modifie pas de façon significative le coefficient d'agglutinabilité.

Il faut cependant noter, que, dans notre expérience, la synchronisation n'a jamais été parfaite (10 à 50 °/o des cellules seulement étant rentrées en mitose de façon simultanée). Des expériences complémentaires sont prévues pour préciser ce point particulier.

IV - SPECIFICITE PAR RAPPORT AU VIRUS INDUCTEUR

La question se pose de savoir s'il existe une spécificité du phénomène par rapport au virus inducteur de la transformation et si les sites contractant des interactions avec la Concanavaline A sont viro-spécifiques, au même titre que les antigènes de surface par exemple.

Les cellules transformées par d'autres virus à ADN que le polyome, tel le SV40 agglutinent en présence de Concanavaline A (INBAR et SACHS 1969 *(137)*). De même, les Oncorna-virus (comme le RSV) peuvent déterminer dans les cellules infectées une agglutinabilité par la Concanavaline A (MOORE et TEMIN 1971 ; BIGUARD et VIGIER 1972 *(183,33)*) et ce caractère nouveau est tout à fait identique.

Ainsi, le phénomène observé n'est pas spécifique du virus polyome. D'une façon plus générale, le phénomène ne nécessite pas une action virale oncogène puisque certaines cellules infectées par des virus réputés non oncogènes, tant à ADN comme le virus vaccinal (ZARLING et TEVETHIA 1971 *(279)*) qu'à ARN comme les myxovirus (BECHT et coll. 1971 et 1972 *(20,21)*), les arbovirus ou les rhabdovirus (BECHT et coll. 1972 *(21)*) peuvent devenir, au moins de façon transitoire, agglutinables par la Concanavaline A.

En allant plus loin, on peut remarquer que le phénomène n'est pas spécifique d'une action virale quelle qu'elle soit puisque des cellules transformées par des agents chimiques ou par des radiations (INBAR et SACHS 1969 *(137)*), voire des cellules "spontanément" transformées in vitro deviennent agglutinables par la Concanavaline A, avec des coefficients α du même ordre de grandeur (BEREBBΓ et coll. 1972 *(29)*).

Par ce caractère univoque, les sites spécifiques de la réaction avec la Concanavaline A se distinguent fondamentalement d'autres signes de la transformation, et en particulier des néo-antigènes tumoraux, dont nous avons dit précèdemment qu'ils étaient parfaitement spécifiques du virus qui les avait induits.

V - SPECIFICITE PAR RAPPORT A LA TRANSFORMATION

De même, le phénomène ne parait pas spécifique de la transformation puisque la Concanavaline A, et les lectines en général peuvent agglutiner :

– Des cellules normales (à très hautes concentrations, il est vrai).

– Les erythrocytes de nombreuses espèces animales (SUMNER et HOWELL 1936 *(249)*).

– Les cellules adultes normales traitées de façon ménagée par les enzymes protéolytiques (INBAR et SACHS 1969 *(136,137)*).

– Les cellules embryonnaires (MOSCONA 1971 ; SIVAK et MOSCONA 1971 *(184,228)*).

– Les cellules adultes normales au moment de la mitose (FOX et coll. 1971 *(90)*).

Cette énumération pose cependant le problème fondamental de savoir quels sont les caractères communs qui peuvent rapprocher ces différents états (état embryonnaire, état en mitose, état trypsiné et état transformé) et expliquer que la cellule réponde à ces différentes actions, tant "endogènes" qu'"exogènes" par une réponse univoque.

Une hypothèse simple peut être faite pour tenter sinon d'expliquer vraiment, du moins d'unifier l'interprétation. Les cellules embryonnaires possèdent, de façon normale des sites de surface ayant, entre autres capacités, celle de contracter des interactions avec la Concanavaline. Quand elles deviennent adultes, ces cellules, par un phénomène de répression au niveau du génome ou par simple synthèse de substances qui viennent se déposer plus superficiellement, perdent la capacité d'être agglutinées par les lectines (mais gardent l'information génétique codant pour les sites, voire les sites eux mêmes à l'état masqué). Cet état non agglutinable est alors l'état normal d'une cellule eucaryote adulte. La cellule peut retrouver un état analogue à l'état embryonnaire, c'est à dire peut redevenir agglutinable :

- Au moment de la mitose,
- Quand elle subit une transformation maligne,
- Après trypsination.

C'est un lieu commun de souligner l'analogie existant entre les cellules cancéreuses, les cellules embryonnaires et les cellules en division. Et cette analogie pourrait trouver ici une nouvelle confirmation, dans la mise en évidence de propriétés de surface communes.

L'effet de trypsination, par contre, qui peut être expliqué simplement, et probablement de façon erronée par un effet de "décapage", de "rabotage" de la surface dévoilant des sites cachés, doit à notre avis être envisagé de façon très nuancée. La digestion ménagée par la trypsine, en effet, est un des facteurs aspécifiques influençant de façon très forte le phénomène d'agglutination lui-même et peut parfaitement entrainer une agglutination au déterminisme purement physico-chimique. Ce point est encore obscur et reste selon nous à éclaircir par des expériences ultérieures.

VI - SPECIFICITE PAR RAPPORT A LA CONCANAVALINE

Nous n'avons pas, nous même, d'expérience des autres lectines et en particulier nous n'avons pas encore pu utiliser l'agglutinine du germe de blé décrite et étudiée par BURGER.

Les données de la littérature, cependant, semblent faire apparaitre une nette différence entre les sites responsables des agglutinations par les différentes lectines, en particulier en ce qui concerne la sensibilité à la température (BEN BASSAT et coll. 1970 ; BURGER et coll. 1971 *(24,43)*).

E – DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS

I - LA TRANSFORMATION STABLE

Pour les différentes souches cellulaires transformées de façon stable par le virus polyome, les résultats des tests d'agglutination n'ont fait que confirmer les données que nous possédions déjà sur les lignées cellulaires utilisées.

Les cellules témoins, normales, cellules de rein de hamster et BHK/21C13 ont présenté un coefficient d'agglutinabilité très faible (inférieur à 2) et une pente P également de faible valeur (de l'ordre de 1).

Les cellules transformées montrent des paramètres qui évoluent de façon tout à fait prévisible :

– La souche CT 54, dont la DT 50 est de l'ordre de 18×10^5 cellules à les caractéristiques suivantes : $P = 2$ et $\alpha = 10$.

– Tandis que la souche SEWA, très tumorigène chez l'animal est caractérisée par des chiffres beaucoup plus hauts : $P = 4$ et $\alpha = 20$.

– Les autres cellules, dont la tumorigénicité était intermédiaire s'étagent entre les valeurs précédentes.

II - LE CYCLE ABORTIF

Dans l'étude du cycle abortif du virus polyome, le principal problème était d'éliminer les effets d'une vague de mitoses induite par l'infection virale, et dont nous savions (FOX et coll. 1971*(90)*) qu'elle pouvait se révèler capable de perturber les résultats. Cette action a été discutée dans un paragraphe précédent.

Nos résultats (reportés dans la figure n° 14) montrent que l'augmentation de l'aptitude à agglutiner liée au seul phénomène mitotique reste toujours négligeable, sortant peu de la zone des variations non significatives. Le cycle mitotique peut peut-être dévoiler des sites de surface fixant la Concanavaline A, mais, en utilisant la technique que nous venons de décrire, il ne semble pas capable de modifier de façon significative le coefficient d'agglutinabilité.

Par contre, et en particulier en milieu riche, il semble que la conjugaison des deux phénomènes amène un dédoublement de la courbe représentant l'agglutinabilité dont le premier pic serait en partie dû à la vague de mitoses induites par l'infection virale alors que l'autre semble en être totalement indépendant. En milieu pauvre, à 0,2 °/o de sérum, les deux phénomènes sont bien indépendants, la vague de mitoses (36e heure) précédant de façon évidente le pic d'agglutinabilité.

Nous pouvons d'ailleurs constater que le second pic d'agglutinabilité indépendant de la mitose en milieu riche et le pic unique en milieu pauvre coïncident tant du point de vue de leur chronologie (52e heure après l'infection) que de leur intensité ($\alpha = 19{,}5 \pm 0{,}5$).

En conclusion, nous pouvons considérer qu'on peut mettre en évidence au cours du cycle abortif du virus polyome sur la cellule BHK 21 une modification viro-induite de la surface cellulaire, et indépendante du cycle mitotique. Cette modification présente un maximum à la 52e heure après l'infection par le virus, puis décroit rapidement pour revenir à la normale aux environs de la 72e heure.

Cette modification s'inscrit dans un ensemble de changements de la cellule au cours du cycle abortif. La place et la signification exacte de ce phénomène seront étudiés dans le chapitre suivant.

F – AGGLUTINATION ET CYCLE ABORTIF

L'infection abortive de la cellule BHK 21 par le virus polyome fait apparaitre de façon transitoire et spontanément regressive l'ensemble des caractères phénotypiques de la transformation maligne. Ces caractères ne deviendront génotypiques et définitifs que pour un petit nombre de cellules (environ 5 °/o). Un phénomène analogue peut être observé chez la cellule de souris 3T3 infectée par le virus SV40.

Ce mécanisme de transformation transitoire est un excellent modèle pour l'étude de la "cancérisation" in vitro.

Un grand nombre de modifications cellulaires ont été décrites au cours de cette transformation abortive, et il était essentiel de savoir ce qu'il advenait de l'agglutinabilité cellulaire en présence de Concanavaline A dans ces conditions. En effet, parmi les phénomènes qui conduisent de la cellule normale à la cellule cancéreuse, il est particulièrement intéressant de distinguer la part des événements résultants de modifications centrales (nucléaires et géniques) de celle des modifications de surface. Ainsi que l'a montré G. MEYER dans une revue générale récente (1971 *(173)*), seule une analyse très précise de ces phénomènes permet de distinguer ceux qui sont directement impliqués dans le mécanisme de la transformation de ceux qui sont seulement la conséquence de cette transformation.

Nous avons vu que les modifications révélées par la Concanavaline A (maximum à la 52e heure), interviennent après l'apparition de l'antigène nucléaire T (maximum à la 6e heure), après la modification spécifique de surface révélée par immunofluorescence (18e heure) et, après l'incorporation de thymidine titrée. Ce phénomène disparait entre la première et la seconde mitose. Il s'agit donc bien d'un phénomène de surface indépendant de la mitose.

Dans notre discussion, nous avons d'ailleurs vu que les cellules à haut potentiel mitotique sont la plupart du temps agglutinables par la Concanavaline A. Par contre, il ne semble pas que cette propriété dérive de ce haut pouvoir mitotique puisque la souche CT54, avec un α de 10 présente une fréquence mitotique inférieure á celle des cellules de la peau.

Parmi les hypothèses que l'on peut envisager, il se peut que cet état particulier de la surface cellulaire rendant l'agglutination possible soit lié à l'activation d'un certain nombre d'enzymes de la surface cellulaire, correspondant aux modifications de la membrane cellulaire procaryote se préparant à la division.

Le tableau n° 11 résume les différentes propriétés des changements de la surface cellulaire.

Il reste à déterminer la séquence exacte des événements métaboliques aboutissant à cette modification de surface. Ce travail peut être entrepris par l'étude de l'action des inhibiteurs métaboliques (FUDR, BUDR, actinomycine D, etc. . .), comme l'ont déjà fait F. BIRG et G. MEYER pour les séquences amenant à des modifications de surface viro-spécifiques. Nous espérons que cette analyse pourra être faite dans un proche avenir.

TABLEAU N°11

PROPRIETES	CHANGEMENTS DE SURFACE				
	Sites Agglutinants	Antigène de Transplantation	Antigène S	Antigènes d'Histocompatibilité normaux	Antigènes Carcino-Embryonnaires
PRESENTS DANS LA CELLULE NORMALE SOUS FORME MASQUEE	+	0	0	+	?
APPARAISSENT APRES TRANSFORMATION VIRALE	+	+	+	+	+
SPECIFIQUES DU VIRUS TRANSFORMANT	0	+	+	0	0
ANTIGENIQUES CHEZ LES HOTES SYNGENIQUES	?	+	+	?	?

PROPRIETES DES DIVERSES MODIFICATIONS DE LA SURFACE CELLULAIRE LORS DE LA TRANSFORMATION

CONCLUSIONS

La surface cellulaire a, pendant longtemps, été considérée comme une simple interface inerte entre le cytoplasme et le milieu extérieur à la cellule. Depuis quelques années, cependant, les phénomènes de surface se sont révélés chaque jour plus fondamentaux en Biologie cellulaire et ils ont fait l'objet d'une masse considérable de travaux, en particulier de la part des Cancérologues.

L'étude analytique directe de ces phénomènes se heurte à de nombreuses difficultés, et l'utilisation de méthodes indirectes s'est rapidement révélée indispensable. Parmi celles-ci, l'emploi de substances végétales, les lectines, qui possèdent la capacité d'agglutiner certaines cellules, et en particulier l'emploi de la Concanavaline A, l'agglutinine du haricot Jacquier, constitue une méthode privilégiée d'étude des modifications de la surface cellulaire au cours de la cancérisation.

Lors de notre séjour dans le Service de Recherche du Centre Anti-cancéreux de Marseille dirigé par Monsieur le Professeur Agrégé Henri BONNEAU, nous nous sommes efforcés sous la responsabilité du Docteur Georges MEYER, de reprendre, d'améliorer et de quantifier les méthodes d'agglutination cellulaire déjà existantes.

Les conditions expérimentales ont été parfaitement précisées, et, nous avons tracé une courbe d'agglutination en fonction du temps sur laquelle il est possible de considérer trois paramètres principaux : le temps de latence t, le stade maximal d'agglutination A et le temps T nécessaire pour atteindre ce plateau. On détermine, de plus, par une transformation mathématique très simple, un coefficient d'agglutinabilité , qui varie proportionnellement au mode de répartition des sites de surface fixant la Concanavaline A. Ce coefficient ainsi défini est représentatif de l'état de surface de la souche considérée.

Les fondements théoriques, la reproductibilité et la specificité de la méthode et la signification de ce nouveau paramètre ont été ensuite analysés et discutés.

Nous avons pu arriver à la conclusion qu'il s'agit d'une méthode capable, dans les conditions expérimentales bien définies qui ont été décrites, d'individualiser un caractère supplémentaire de la transformation cancéreuse. Nous avons montré que ce caractère évoluait de façon parallèle aux critères classiques de la transformation et en particulier parallèlement à la tumorigénicité chez l'animal syngénique, qui reste le test fondamental.

Finalement, cette technique a été appliquée à l'étude des modifications de surface d'un certain nombre de souches cellulaires transformées de façon stable par le virus polyome et à la cinétique des modifications de surface de la cellule BHK 21 au cours du cycle abortif de ce même virus.

Le virus polyome est un virus oncogène à ADN, du groupe des Papova virus, qui

peut contracter trois types d'interactions différentes avec les cellules vivantes selon la nature de celles ci. Son cycle abortif sur cellules BHK 21 constitue un modèle particulièrement intéressant permettant de suivre une transformation transitoire et spontanément regressive,

Il nous a ainsi été possible de mettre en évidence un maximum de modifications, se caractérisant par un pic d'agglutinabilité et survenant à la 52e heure après l'infection virale. Une analyse de ce résultat a permis d'éliminer l'action d'une vague mitotique, dont on sait qu'elle provoque, elle aussi, des modifications de l'agglutinabilité cellulaire. Nous avons précisé, de plus, que au cours du cycle abortif, l'événement ainsi mis en évidence suit la survenue d'autres modifications de surface (et en particulier l'apparition de néo-antigènes virospécifiques mis en évidence par immunofluorescence) mais qu'il précède la mitose toujours induite par l'infection virale. Les corrélations qui peuvent exister entre ces différents phénomènes ont été discutées.

Il semble que la modification temporaire qui a ainsi été révélée soit bien impliquée dans le phénomène de la transformation cancéreuse elle-même. Le problème fondamental reste posé de savoir si elle en est simplement le témoin ou si elle participe de façon directe à son déterminisme propre. Une analyse plus détaillée doit en être faite, en utilisant des inhibiteurs du métabolisme des acides nucléiques et des protéines pour essayer de traduire cette altération en termes moléculaires. Nous n'avons fait, pour notre part, que poser la question.

Vu et approuvé
Le Doyen

Signé : H. ROUX

Lu et aprouvé
Le Président du Jury

Signé : J. TAMALET

BIBLIOGRAPHIE

1 - ABERCROMBIE M. et AMBROSE E.J.
The surface of cancer cells
Cancer Research – 1962 (22, 525-548)

2 - ACHESON N.H., BUETTI E., SHERRER K. et WEIL R.
Transcription of the Polyoma virus genome : synthesis and cleavage of giant late polyoma-specific RNA
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 2231-2235)

3 - AGRAWAL B.B.
Protein carbohydrate interaction : Physical and chemical studies on Concanavalin A, the hemagglutinin of the Jack-bean
Arch. Biochem. – 1968 (124, 218-229)

4 - AGRAWAL B.B. et GOLDSTEIN I.J.
Specific binding of Concanavalin A to cross-linked dextran gels
Biochem. J. – 1965 (96, 23C-25C)

5 - AGRAWAL B.B. et GOLDSTEIN I.J.
Protein carbohydrate interaction : Isolation of Concanavalin A by specific adsorption on cross-linked dextran gels
Biochem. Biophys. Acta – 1967 (147, 262-271)

6 - AGRAWAL B.B. et GOLDSTEIN I.J.
Physical and chemical characterization of Concanavalin A, the hemagglutinin from Jack-bean
Biochem. Biophys. Acta – 1967 (133, 376-379)

7 - AGRAWAL B.B. et GOLDSTEIN I.J.
Protein carbohydrate interaction : Physical and chemical studies on Concanavalin A, the hemagglutinin of the Jack-bean
Arch. Biochem. and Biophys. – 1968 (124, 218-229)

8 - AGRAWAL B.B., GOLDSTEIN I.J., IRVING J., HASSING G.S. et SO L.L.
Protein carbohydrate interaction : The preparation and properties of acetyled Concanavalin A, the agglutinin of the Jack-bean
Biochemistry – 1968 (7, 4211-4218)

9 - ALLAN D., AUGER J. et CRUMPTON M.J.
Glycoprotein receptors for Concanavalin A isolated from pig lymphocyte plasma membrane by affinity chromatography in sodium deoxycholate
Nature New Biology – 1972 (236, 23-25)

10 – ARCHIBALD A.R. et COAPES H.E.
The interaction of Concanavalin A with teichoic acids an bacterial walls
Biochem. J. – 1971 (123, 665-668)

11 - ARNDT-JOVIN J.D. et BERG P.
Quantitative binding of 125 I-Concanavalin A to normal and transformed cells
J. Virol. – 1971 (8, 716-721)

12 - AUB J.C., SANFORD B.H. et COTE M.N.
Studies on reactivity of tumour and normal cells to a wheat-germ agglutinin
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1965 (54, 396-399)

13 - AUB J.C., TIESLAU C. et LANKESTER A.
Reaction of normal and tumor cell surfaces to enzymes. Wheat-germ lipase and associated mucopolysaccharides
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1963 (50, 613-619)

14 - AVRAMEAS S.
Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies
Immunochemistry – 1969 (9, 43)

15 - AVRAMEAS S.
Emploi de la Concanavaline A pour l'isolement, la détection et la mesure des glycoprotéines et glucides extra et endocellulaires
C. R. Acad. Sci. Paris – 1970 (270, 2205-2208)

16 - BANFIELD W.G., DAWE C.J. et BRINKLEY D.C.
Intracellular and extracellular particles in tissue cultures inoculated with parotid-tumor agent (polyoma virus)
J. Nat. Cancer inst. – 1959 (23,1123-1136)

17 – BARRA Y., de MICCO Ph., LAVY M.E. et MEYER G.
Détermination du nombre de sites cellulaires fixant la Concanavaline A par un test de consommation
C. R. Acad. Sci. Paris – 1972 (274, 966-969)

18 - BARSKI G., CHLAP Z.B., GOTLIEB-STEMASKY T. et CHARLIER M.K.
Tumeurs malignes et maladie hémorragique chez les hamsters adultes inoculés avec le virus polyome
Bull. Fr. du Cancer – 1961 (48, 317-330)

19 - BASILICO G.
The multiplication of polyoma virus in mouse-hamster somatic hybrids
Colloque LEPETIT n° 2 "Biologie des virus oncogènes" – 1971 (2, 12-27)

20 - BECHT H., ROTT R. et KLENK H.D.
Agglutination of cells infected with myxovirus by Concanavalin A
Zeitschrift für Medizinische Mikrobiologie und Immunologie – 1971 (156, 305)

21 - BECHT H., ROTT R. et KLENK H.D.
Effect of Concanavalin A on cells infected with envelopped RNA viruses
J. Gen. Virol. – 1972 (14, 1-8)

22 - BECKER J.W., REEKE G.N. et EDELMAN G.M.
Location of saccharide binding site of Concanavalin A
J. Biol. Chem. – 1971 (246, 6123-6125)

23 - BECKERT W.H. et SHARKEY M.M.
Mitogenic activity of the Jack-bean with rabbit peripherical blood lymphocytes
Int. Arch. Allergy Appl. Immunology – 1970 (39, 337-341)

24 - BEN BASSAT H., INBAR M. et SACHS L.
Requirement for cell replication after SV40 infection for a structural change of the cell surface membrane
Virology – 1970 (40, 854-859)

25 - BEN BASSAT H., INBAR M. et SACHS L.
Changes in the structural organisation of the surface membrane in malignant cell transformation
J. Membrane Biol. – 1971 (6, 183-194)

26 BENJAMIN T.L.
Virus specific RNA in cells productively infected or tranformed by polyoma virus
J. Mol. Biol. – 1966 (16, 359-373)

27 - BENJAMIN T.L.
Host range mutants of polyoma virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1970 (67,394-399)

28 - BENJAMIN T.L. et BURGER M.M.
Absence of a cell membrane alteration function in non-transforming mutants of polyoma virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1970 (67, 929-934)

29 - BEREBBI M., de MICCO Ph. et MEYER G.
Transformation in vitro d'une nouvelle lignée cellulaire d'embryons de hamster chinois : évolution de la transplantabilité, du caryotype et de la surface cellulaire
C. R. Acad. Sci. Paris – 1972 (274, 772-775)

30 - BERLIN M.
Concanavalin A : effect on phagocytosis
Nature New Biology – 1972 (235, 44-46)

31 - BERNHARD W. et AVRAMEAS S.
Ultrastuctural visualization of cellular carbohydrate components by means of Concanavalin A
Exp. Cell. Res. – 1971 (64, 232-237)

32, - BERNHARD W. FEBVRE H.L. et CRAMER R.
Mise en évidence au microscope électronique d'un virus dans des cellules infectées in vitro par l'agent du polyome
C. R. Acad. Sci. Paris – 1959 (249, 483-485)

33 - BIGUARD J.M. et VIGIER Ph.
Agglutination par la Concanavaline A de fibroblastes d'embryon de poule transformés par le virus de ROUS et de mutants thermosensibles de ce virus
C. R. Acad. Sci. Paris – 1972 (274, 144-147)

33 bis - BLACK P.M. in Annual Review of Microbiology – 1968 (22, 391-426)

34 - BLACKSTEIN M.E., STANNERS C.P. et FARMILO A.J.
Heterogeneity of polyoma virus DNA : Isolation and characterization of non-infectious small supercoiled molecules
J. Mol. Biol. – 1969 (42, 301-315)

35 - BONNEAU H.P.
Pathologie d'une tumeur salivaire transplantable viro-induite chez la souris AKR (Apport à l'étude des tumeurs myo-épithéliales)
Mémoire pour l'obtention du CES d'Anatomie pathologique – Marseille 1971

36 - BONNEAU H. et CESARINI J.P.
Mise en évidence en microscopie électronique des glycoprotéines de surface sur les cellules transformées par le virus polyome et le virus de Rous
Fourth European Regional Conference on Electron Microscopy (Rome) – 1968 (577-578)

37 - BOURGAUX P., BOURGAUX-RAMOISY D. et STOKER M.G.P.
Further studies on transformation by DNA from Polyoma virus
Virology – 1965 (25, 364-371)

38 - BOYD W.C.
The lectines : their present status
Vox. Sang. – 1963 (8, 1-32)

39 - BURGER M.M.
A difference in the architecture of the surface membrane of normal and virally transformed cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1969 (62, 994-1001)

40 - BURGER M.M.
Forssman antigen exposed on the surface membrane after transformation
Nature New Biology – 1971 (231, 125-126)

41 - BURGER M.M. et GOLDBERG A.R.
Identification of a tumor-specific determinant on neoplastic cell surfaces
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1967 (57, 359-366)

42 - BURGER M.M. et NOONAN K.D.
Restoration of normal growth by covering of agglutinin sites on tumor cell surface
Nature – 1970 (228, 512-515)

43 - BURGER M.M., NOONAN K.D., SHEPPARD Jr., FOX T.O. et LEVINE A.J.
Requirements for the formation of a structural surface change after viral infection and the significance of this change for growth control
Colloque LEPETIT n°2 "Biologie des virus oncogènes" – 1971 (2, 258-267)

44 - CALAFAT J. et HAGEMAN P.
Binding of Concanavalin A to the enveloppe of two murine RNA tumor viruses
J. Gen. Virol. – 1972 (14, 103-106)

45 - CASPAR D.L. et KLUG A.
Physical principles in the construction of regular viruses
Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology – 1962 (27, 1-24)

46 - CESARINI J.P. et BONNEAU H.
Mise en évidence par la technique de RAMBOURG des glycoprotéines d'une souche transformée par le virus polyome.
C. R. Soc. Biol. – 1968

47 - CIFONELLI
J. Am. Chem. Soc. – 1956 (78, 2485)

48 - CLARKE A.E. et DENBOROUGH M.A.
The interaction of Concanavalin A with blood-group substances glycoprotéins from human secretions
Biochem. J. – 1971 (121, 811-816)

49 - CLINE M.J. et LIVINGSTON D.C.
Binding of 3 H-Concanavalin A by normal and transformed cells
Nature New Biology – 1971 (232, 155-156)

50 - COCHRAN A.J.
Tumour cell migration
Europ. J. Clin. Biol. Res. – 1971 (16, 44-47)

51 - COWIE D.B. et MAC CARTHY B.J.
Homology between bacteriophage lamda DNA and E. coli DNA
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1963 (50, 537-543)

52 - CRAMER R., DAVIDSON R., YOSHIKURA H. et MEYER G.
A specific inhibitor of polyoma virus replication apearing in polyoma virus infected rat hamster cells and persisting in hamster cell clones transformed by this virus
A paraitre

53 - CRAWFORD L.V.
The adsorption of polyoma virus
Virology – 1962 (18, 177-181)

54 - CRAWFORD L.V.
The physical characteristics of polyoma virus. II the nucleic acid
Virology – 1963 (19, 279-282)

55 - CRAWFORD L.V.
The physical characteristics of polyoma virus. IV The size of the DNA
Virology – 1964 (22, 149-152)

56 - CRAWFORD L.V. et CRAWFORD E.M.
A comparative study of polyoma and papilloma viruses
Virology – 1963 (21, 258-263)

57 - CRAWFORD L.V., CRAWFORD E.M. et WATSON D.H.
The physical characteristics of polyoma virus. I Two types of particles
Virology – 1962 (18 ,170-176)

58 - CRAWFORD L.V., DULBECCO R., FRIED M., MONTAGNIER L. et STOKER M.G.P.
Cell transformation by different forms of polyoma virus DNA
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1964 (52, 148-152)

59 - CURTIS A.S.G.
The cell surface
LOGOS PRESS – LONDON – 1967

60 - CUZIN F., VOGT M., DIECKMANN M. et BERG P.
Induction of virus multiplication in 3T3 cells transformed by a thermosensitive mutant of polyoma virus
J. Mol. Biol. – 1970 (47, 317-333)

61 - DANIEL Ph. et DELSAL J.L.
Concentration et chromatographie du virus polyome
C. R. Acad. Sci. Paris – 1962 (255, 1663-1665)

62 - DANIEL Ph. et DELSAL J.L.
Concentration et chromatographie du pouvoir infectieux et hémagglutinant du virus polyome
Path. Biol. – 1964 (12, 43-46)

63 - DAWE C.J., LAW L.W. et DUNN T.B.
Studies on parotid-tumor agent in cultures of leukemic tissues of mice
J. Nat. Cancer Inst. – 1959 (23, 717-797)

64 - DEFENDI V. et GASIC G.
Surface mucopolysaccharides of polyoma virus transformed cells
J. Cell. Comp. Physiol. – 1963 (62, 23-31)

65 - DEFENDI V. et LEHMAN J.M.
Transformation of hamster embryo cells in vitro by polyoma virus : morphological, karyological, immunological and transplantation characteristics
J. Cell. Comp. Physiol. – 1965 (66, 351-410)

66 - DEFENDI V. et TAGUCHI F.
Studies with the complement fixing antigen induced by polyoma virus
Ann. Med. Exp. Fen. – 1966 (44, 232-241)

67 - DI MAYORCA G. et CALLENDER J.
Significance of temperature sensitive mutants in viral oncology
Progress in Medical Virology – 1970 (12, 284-301)

68 - DI MAYORCA G., CALLENDER J., MARIN G. et GIORDANO R.
Temperature-sensitive mutants of polyoma virus
Virology – 1969 (38, 126-133)

69 - DI MAYORCA G.A., EDDY B.E., STEWARD S.E., HUNTER W.S., FRIEND C. et BENDISH H.
Isolation of infectious desoxyribonucleic acid from SE polyoma-infected tissue cultures
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1959 (45, 1805-1808)

70 - DOYLE R.J. et BIRSDELL D.C.
Interaction of Concanavalin A with the cell wall of Bacillus subtilis
J. Bacteriol – 1972 (109, 652-658)

71 - DOYLE R.J., WOODSIDE E.E. et FISHEL C.W.
Protein-carbohydrate interaction : The Concanavalin A precipitin reaction with polyelectrolytes and polysaccharides derivatives
Biochem. J. – 1968 (106, 35-40)

72 - DULBECCO R. et ECKHARDT W.
Temperature-dependant properties of cells transformed by a thermo-sensitive mutant of polyoma virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1970 (67, 1432-1439)

73 - DULBECCO R. et VOGT M.
Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses
J. Exp. Med. – 1954 (99, 167-199)

74 - DULBECCO R. et VOGT M.
Evidence for a ring structure of polyoma virus DNA
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1963 (50, 236-243)

75 - EAGLE H.
Amino-acid metabolism in mammalian cell cultures
Science – 1959 (130, 432-437)

76 - ECKHART W.
Complementation and transformation by temperature sensitive mutants of polyoma virus
Virology – 1969 (38, 120-125)

77 - ECKHART W.
Induction of cellular DNA synthesis after infection by polyoma virus
Colloque LEPETIT n° 2 "Biologie des virus oncogènes" – 1971 (2, 290-293)

78 - ECKHART W., DULBECCO R. et BURGER M.M.
Temperature-dependant surface changes in cells infected or transformed by a thermosensitive mutant of polyoma virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 283-286)

79 - EDDY B.E. et ROWE W.P.
Hemagglutination with the SE polyoma virus
Virology – 1958 (6, 290-291)

80 - EDDY B.E. et STEWART S.E.
Physical properties and hemagglutining and cytopathogenic effects of the polyoma virus
Proc. Third Canada Conf. (Honey Harbour – Ontario) – 1958 (3, 307-324)

81 - EDDY B.E. et STEWART S.E.
Induction of tumors in rats by tissue-culture preparations of SE polyoma virus
J. Nat. Cancer Inst. – 1959 (22, 161-171)

82 - EDDY B.E. et STEWART S.E.
Induction of subcutaneous nodules in rabbits with the SE polyoma virus
Nature – 1959 (183, 766-767)

83 - EDDY E.B., STEWART S.E. et BERKELEY W.
Cytopathogenicity in tissue cultures by a tumor virus from mice
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1958 (98, 848-851)

84 - EDDY B.E., STEWART S.E. et TOUCHETTE R.H.
Effects of immunization of adult femal hamsters on the latency of infection in offspring inoculated with the SE polyoma virus
Fed. Proc. – 1959 (18, 565-570)

85 - FOGEL M.
Acta Unio Int. Contra Canrum – 1963 (19, 175-180)

86 - FOGEL M. et SACHS L.
The activation of virus synthesis in polyoma-transformed cells
Virology – 1969 (37, 327-334)

87 - FOGEL M. et SACHS L.
Induction of virus synthesis in polyoma transformed cells by ultraviolet light and mitomycin D
Virology – 1970 (40, 174-177)

88 - FORRESTER J.A., AMBROSE E.J. et MACPHERSON I.A.
Electrophoretic investigation of a clone of hamster fibroblasts and polyoma-transformed cells from the same population
Nature – 1962 (196, 1068-1070)

89 - FORRESTER J.A., AMBROSE E.J. et STOKER M.G.P.
Microelectrophoresis of normal and transformed clones of hamster kidney fibroblasts
Nature – 1964 (201, 945-946)

90 - FOX T.O., SHEPPARD R.J. et BURGER M.M.
Cyclic membrane changes in animal cells : transformed cells permanently display a surface architecture detected in normal cells only during mitosis.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 244-247)

91 - FRIBERG S., COCHRAN A.J. et GOLUB S.H.
Concanavalin A inhibits tumor cell migration
Nature New Biology – 1971 (232, 121-122)

92 - FRIED M.
Isolation of temperature sensitive mutants of polyoma virus.
Virology – 1965 (25, 669-671)

93 - FRIED M.
Cell transforming ability of a temperature sensitive mutant of polyoma virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1965 (53, 486-491)

94 - FRIED M.
Characterization of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus
Virology – 1970 (40, 605-617)

95 - FUJINAGA K. et GREEN M.
The mecanism of viral carcinogenesis by DNA mammalian viruses. I-Viral-specific RNA in polyribosomes of adenovirus tumor and transformed cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1966 (55, 1567-1574)

96 - FUJINAGA K. et GREEN M.
The mechanism of viral carcinogenesis by DNA mammalian viruses. II-Viral specific RNA in tumor cells induced by " weakly " oncogenic human adenovirus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1967 (57, 806-812)

97 - GEORGE M. et VAUGHAN J.H.
In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1962 (111, 514-521)

98 - GOLDSTEIN I.J.
Protein-carbohydrate interaction. The interaction of Concanavalin A with dextranes from Streptococcus bovis and a synthetic alpha glucan
Arch. Biochem. – 1968 (127, 787-789)

99 - GOLDSTEIN I.J.
Interaction of Concanavalin A with polysaccharides of Salmonellae
Immunochemistry – 1970 (7, 315-319)

100 - GOLDSTEIN I.J., HOLLERMAN C.E. et MERRICK J.M.
The interaction of polysaccharides with Concanavalin A
Biochem. Biophys. Acta – 1965 (97, 68-76)

101 - GOLDSTEIN I.J., HOLLERMAN C.E. et SMITH E.E.
Protein-carbohydrate interaction. Inhibition studies on the interaction of Concanavalin A with polysaccharides
Biochemistry – 1965 (4, 876-883)

102 - GOLDSTEIN I.J. et IYER R.N.
Interaction of Concanavalin A, a phytohemagglutinin, with model substrates
Biochem. Biophys. Acta – 1966 (121, 197-200)

103 - GOLDSTEIN I.J., IYER R.N., SMITH E.E. et SO L.L.
Protein-carbohydrate interaction. The interaction of Concanavalin A with Sepharose and some of its derivatives
Biochemistry – 1967 (6, 2373-2377)

104 - GOLDSTEIN I.J. et SO L.L.
Protein carbohydrate interaction. Agar gel diffusion studies on the interaction of Concanavalin A with polysaccharides
Arch. Biochem. Biophys. – 1965 (111, 407-414)

105 - GOLDSTEIN I.J., SO L.L., YANG Y. et CALLIES Q.C.
The interaction of Concanavalin A with IgM and the glycoprotein of phytohemagglutinins of the waxbean and the soybean
J. Immun. – 1969 (103, 695-698)

106 - GOODHEART
An introduction to Virology
1969

107 - GORET P. et PROVOST A.
Les virus des cancers animaux. Réflexions sur l'étiologie et la pathogénie du cancer
Rev. Med. Vet. – 1966 (142, 83-215)

108 - GRABAR P. et WILLIAMS C.A.
Méthodes permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au sérum humain
Biochem. Biophys. Acta – 1953 (10, 193-194)

109 - GRAFFI A. et GIMMY J.
Zur histologie der durch den BB/T2 polyoma virustamm bei kaninchen und meerschweinchen induzierten geschwülste
Acta Biol. Med. Germ. – 1962 (9, 167)

110 - GREEN M.H.
Oncogenic viruses
Ann. Rev. Biochem. – 1970 (39, 701-756)

111 - GREEN M.H., MILLER H.I. et HENDLER S.
Isolation of a polyoma-nucleoprotein complex from infected mouse cells cultures
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 1032-1036)

112 - GREER J., KAUFMAN H.W. et KALB A.J.
An X-ray cristallographic study of Concanavalin A
J. Mol. Biol. – 1970 (48, 365-366)

113 - GROSS L.
" Spontaneous " leukemia developping in C3H mice following inoculation, in infancy, with Ak leukemic extracts or Ak embryos
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1951 (76, 27-32)

114 - GROSS L.
Neck tumors, or leukemia, developping in adult C3H mice following inoculation, in early infancy, with filtered or centrifuged Ak-leukemic extracts
Cancer – 1953 (6, 948-957)

115 - HABEL K.
Resistance of polyoma virus immune animals to transplanted polyoma virus
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1961 (106, 722-725)

116 - HABEL K.
Polyoma tumor antigens in cells transformed in vitro by polyoma virus
Virology – 1962 (18, 553-558)

117 - HABEL K.
Antigenic properties of cells transformed by polyoma virus
Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology – 1962 (27, 433-439)

118 - HABEL K.
Immunological determinants of polyoma virus oncogenesis
J. Exp. Med. – 1962 (115, 181-193)

119 - HABEL K.
Specificity complement-fixing antigens in polyoma tumor and transformed cells
Virology – 1965 (25, 51-61)

120 - HANAFUSA H.
Advan. Cancer Res. – 1969 (12, 137-165)

121 - HARDMANN K.D., WOOD M.W., SCHIFFER M., EDMUNDSON A.B. et AINSWORTH C.F.
Structure of Concanavalin A at 4,25 Å resolution
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 1393-1397)

122 - HARE J.D.
Transplant immunity to polyoma virus-induced tumor cells : a polyoma strain defective in transplant antigen induction
Virology – 1967 (31, 625-632)

123 - HARE J.D.
Analysis of hamster tumor cell lines isolated from single colonies soon after induction by polyoma strains in transplant antigen production
J. Virol. – 1967 (1, 905-911)

124 - HARTLEY J.W. et ROWE W.P.
Studies of mouse polyoma infection. Evidence for muco-protein erythrocyte receptors in polyoma virus hemagglutination
J. Exp. Med. – 1959 (110, 81-91)

125 - HASSING G.S. et GOLDSTEIN I.J.
Ultraviolet difference spectral studies on Concanavalin A carbohydrate interaction
Eur. J. Biochem. – 1970 (16, 549-556)

126 - HASSING G.S., GOLDSTEIN I.J. et MARINI M.
Role of carboxyl groups in carbohydrate-Concanavalin A interaction
Biochem. Biophys. Acta. – 1971 (243, 90-97)

127 - HAUSE L.L., PATTILLO R.A., SANCES A. Jr et MATTINGLY R.F.
Cell surface coatings and membrane potentials of malignant and non-malignant cells
Science – 1970 (169, 601-603)

128 - HELLSTROM K.E., HELLSTROM I. et SJOGREN H.O.
Further studies on karyotypes of a variety of primary and transplanted mouse polyoma tumors
J. Nat. Cancer Inst. – 1963 (31, 1239-1253)

129 - HIRT B. et GESTELAND R.F.
Characterization of proteins of SV40 and polyoma virus
Colloque LEPETIT nº 2 " Biologie des virus oncogènes " – 1971 (2, 98-103)

130 - HITOTSUMACHI S., RABINOWITZ Z. et SACHS L.
Chromosomal control of reversion in transformed cells
Nature – 1971 (231, 511-513)

131 - HORISBERGER M., BAUER H. et BUSH D.A.
Mercury-labelled Concanavalin A as a marker in electron microscopy localisation of mannan in yeast cell walls
Febs Letters – 1971 (18, 311-314)

132 - HOWATSON A.F. et CRAWFORD L.V.
Direct counting of the capsomers in polyoma and papilloma viruses
Virology – 1963 (21, 1-6)

133 - INBAR M., BEN BASSAT H. et SACHS L.
Location of aminoacids and carbohydrate transport sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells
J. Memb. Biol. – 1971 (6, 195-209)

134 - INBAR M., BEN BASSAT H. et SACHS L.
A specific metabolic activity on the surface membrane in malignant cell-transformation
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 2748-2751)

135 - INBAR M., RABINOWITZ Z. et SACHS L.
The formation of variants with a reversion of properties of transformed cells. III-Reversion of the structure of the cell surface membrane
Int. J. Cancer – 1969 (4, 690-696)

136 - INBAR M. et SACHS L.
Structural difference in sites on the surface membrane of normal and transformed cells
Nature – 1969 (223, 710-712)

137 - INBAR M. et SACHS L.
Interaction of the carbohydrate-binding protein Concanavalin A with normal and transformed cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1969 (63, 1418-1425)

138 - INBAR M. et SACHS L.
Structural differences in sites on the surface membrane of normal and transformed cells
Nature – 1969 (223, 710-712)

139 - IRLIN I.S.
Immunofluorescent demonstration of a specific surface antigen in cells infected or transformed by polyoma virus
Virology – 1967 (32, 725-728)

140 - ISHIKAWA A. et DI MAYORCA G.
Recombination between two temperature-sensitive mutants of polyoma virus
Colloque LEPETIT nº 2 " Biologie des virus oncogènes " – 1971 (2, 294-299)

141 - JONES D.B. et JOHNS C.O.
J. Biol. Chem. – 1916 (28, 59)

142 - JOUBERT L. et TUAILLON P.
La systématique moderne des virus animaux
Rev. Méd. Vet. – 1965 (136, 95)

143 - KAHLER H. et ROWE W.P.
Electron microscopy of mouse parotid tumor polyoma virus
J. Nat. Cancer Inst. – 1959 (22, 647-657)

144 - KALB A.J. et LEVITZKI A.
Metal-binding sites of Concanavalin A and their role in the binding of alpha-methyl-D-glucopyranoside
Biochem. J. – 1968 (109, 669-672)

145 - KALB A.J. et LUSTIG A.
The molecular weight of Concanavalin A
Biochem. Biophys. Acta – 1968 (168, 366-367)

146 - KIND L.S. et PETERSEN W.A.
Concanavalin A in vivo : induction of hemorragic skin lesions (Arthus-like lesions) in mice
Science – 1968 (160, 312-313)

147 - KLEIN G.
Tumor antigens
Ann. Rev. Microbiol – 1966 (20, 223-290)

148 - LALLIER R.
Les effets de la Concanavaline A sur la fécondation et le développement de l'œuf de l'oursin Paracentrotus lividus
C.R. Acad. Sci. Paris – 1971 (272, 1676-1679)

149 - LEON M.A.
Concanavalin A reaction with human normal IgG and myeloma IgG
Science – 1967 (158, 1325-1326)

150 - LEON M.A. et YOUNG N.M.
Concanavalin A : a reagent for sensitization of erythrocytes with glycoproteins and polysaccharides
J. Immun. – 1970 (104, 1556-1557)

151 - LEVY H.B.
The biochemistry of viruses
1969

152 - LHERISSON – STRABONI A.M.
Contribution à l'étude des antigènes tumoraux induits par le virus polyome
Thèse Médecine Marseille – 1969

153 - LHERISSON – STRABONI A.M., MEYER G. et BONNEAU H.
Détection d'un antigène de membrane dans le système tumoral polyome-hamster
Bull. du Cancer – 1967 (54, 419-422)

154 - LIS H., SELA B., SACHS L. et SHARON N.
Specific inhibition by N-acetyl-D-galactosamine of the interaction between soybean agglutinin and animal cell surface
Biochem. Biophys. Acta – 1970 (211, 582-585)

155 - LIS H., SHARON N. et KATCHALSKI E.
Identification of the carbohydrate protein linking group in soybean hemagglutinin
Biochem. Biophys. Acta – 1959 (192, 364-366)

156 - LLOYD K.O.
The preparation of two insoluble forms of the phytohemagglutinin Concanavalin A, and their interactions with polysaccharides and glycoproteins
Arch. Biochem. – 1970 (137, 460-468)

157 - LURIA S.E.
General virology
1967

158 - LWOFF A., HORNE R.W. et TOURNIER P.
Un système des virus
C. R. Acad. Sci. Paris – 1962 (254, 4225-4227)

159 - LWOFF A. et TOURNIER P.
The classification of viruses
Ann. Rev. Microbiol. – 1966 (20, 45-74)

160 - MAC PHERSON I.
Characteristics of a hamster cell clone transformed by polyoma virus
J. Nat. Cancer Inst. – 1963 (30, 795-815)

161 - MAC PHERSON I. et MONTAGNIER L.
Agar suspension culture for the selection assayof cells transformed by polyoma virus
Virology – 1964 (23, 291-294)

162 - MAC PHERSON I. et STOCKER M.G.P.
Polyoma transformation of hamster - cell clones. An investigation of genetic factors affecting cell competence
Virology – 1962 (16, 147-151)

163 - MALMGREEN R.A., TAKEMOTO K.K. et CARNEY P.G.
Immunofluorescent studies of mouse and hamster cell surface antigen induced by polyoma virus
J. Nat. Cancer Inst. – 1968 (40, 263-268)

164 - MANNERS D.J. et WRIGHT A.J.
J. Chem. Soc. – 1962 (4, 4592)

165 - MARKOWITZ H.
Interaction of Concanavalin A with polysaccharides of Histoplasma capsulatum
J. Imm. – 1969 (103, 308-317)

166 - MARKOWITZ H., PERSON D.A. et GITNICK G.L.
Immunosuppressive activity of Concanavalin A
Science – 1969 (163, 476-478)

167 - MARTINEZ-PALOMO A.
The surface coat of animal cells
Intern. Rev. Cyto. – 1970 (29, 29-75)

168 - MARTINEZ-PALOMO A., BRAISLOSKY E. et BERNHARD W.
Ultrastructural modifications of the cell surface of some transformed cells
Cancer Research – 1969 (29, 925-937)

169 - MATTERN C.F.
Polyoma and papilloma viruses : do they have 42 or 92 subunits ?
Science – 1962 (137, 612-613)

170 - MAYOR H.D.
Acridine orange staining of purified polyoma virus
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1961 (108, 103-105)

171 - MEDINA D. et SACHS L.
Studies on the lytic interaction and cell transformation with a large plaque and a small-plaque mutant of polyoma virus
Virology – 1963 (19, 127-139)

172 - MELNICK J.L.
Papova virus group
Science – 1962 (135, 1128-1130)

173 - MEYER G.
Viral genome and oncogenic transformation : nuclear and plasma membrane events
Advances in Cancer Research – 1971 (14, 71-153)

174 - MEYER G., CRAMER R. et YOSHIGURA H.
Comparative study of the action of the specific polyoma virus inhibitor of the polyoma capsid antigen and on the polyoma tumor antigen formation
Int. J. Cancer – à paraître

175 - MEYER G., DE VAUX SAINT CYR C. et NOSNY M.A.
Mise en évidence de sites antigéniques communs entre la surface des hématies de mouton et la surface de certaines cellules de hamster viro-transformées
C.R. Acad. Sci. Paris – 1971 (272, 1928-1931)

176 - MEYER G., LHERISSON A.M. et BONNEAU H.
Evolution en immunofluorescence de l'antigène tumoral induit par le virus polyome dans la cellule BHK21
Bull. du Cancer – 1967 (54, 79-86)

177 - MEYER G., LHERISSON-STRABONI A.M. et BONNEAU H.
Sensibilité différentielle aux rayons UV de quelques fonctions du virus polyome
Int. J. Cancer – 1969 (4, 520-532)

178 - MEYER G., LHERISSON A.M. et LOKO H.
Rapport entre la multiplicité d'infection par le virus polyome et l'induction de l'antigène tumoral nucléaire
C. R. Soc. Biol. – 1967 (161, 1124-1126)

179 - de MICCO P. et MEYER G.
Essai de quantification de l'agglutination par la Concanavaline A de cellules transformées
C. R. Soc. Biol. – 1971 (165, 611-613)

180 - MICHEL M.R., HIRT B. et WEIL R.
Mouse cellular DNA enclosed in polyoma viral capsids (pseudovirions)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1967 (58, 1381-1388)

181 - MONTAGNIER L.
Altérations de la surface cellulaire induites par des virus oncogènes et leur rôle dans la transformation maligne
Bull. du Cancer – 1970 (57, 13-22)

182 - MONTAGNIER L. et MAC PHERSON I.
Croissance sélective en gélose de cellules de hamster transformées par le virus du polyome
C. R. Acad. Sci. Paris – 1964 (258, 4171-4173)

183 - MOORE E.G. et TEMIN H.M.
Lack of correlation between conversion by RNA tumor-viruses and increased agglutinability of cells by Concanavalin A and wheat germ agglutinin
Nature – 1971 (231, 117-118)

184 - MOSCONA A.A.
Embryonic and neoplastic cell surfaces : availability of receptors for Concanavalin A and wheat germ agglutinin
Science – 1971 (171, 905-907)

185 - NICOLAU C., KALB A.J. et YARIV J.
Electron spin resonance of the transition metal binding site of Concanavalin A
Biochem. Biophys. Acta – 1969 (194, 71-73)

186 - NICOLSON G.L.
Difference in topology of normal and tumor cell membranes shown by different surface distributions of ferritin-conjugated Concanavalin A
Nature New Biology – 1971 (233, 244-246)

187 - NICOLSON G.H. et SINGER S.J.
Ferritin-conjugated plant agglutinins as specific saccharide strains for electron microscopy : application to saccharides bound to cell membranes
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 942-945)

188 - NORDIN A.A., COSENZA H. et HOPKINS W.
The use of Concanavalin A for distinguishing IgM from IgG antibody-producing cells
J. Immun. – 1969 (103, 859-861)

189 - NOVOGRODSKY A. et KATCHALSKI E.
Lymphocyte transformation induced by Concanavalin A and its reversion by methyl-alpha-D-mannopyranoside
Biochem. Biophys. Acta – 1971 (228, 579-583)

190 - OBERLING C. et GUERIN M.
The role of viruses in the production of cancer
Adv. Cancer Res. – 1954 (2, 353-423)

191 - OLSON M.O. et LIENER I.E.
Some physical and chemical properties of Concanavalin A, the phytohemagglutinin of the Jackbean
Biochemistry – 1967 (6, 105-119)

192 - OLSON M.O. et LIENER I.E.
The association and dissociation of Concanavalin A, the phytohemagglutinin of the Jackbean
Biochemistry – 1967 (6, 3801-3808)

193 - O'NEILL C.H.
J. Cell Sci. – 1968 (3, 405-422)

194 - ORAM J.D., ELLWOOD D.C., APPLEYEARD G. et STANLEY J.L.
Agglutination of an arbovirus by Concanavalin A
Nature New Biology – 1971 (233, 50-51)

195 - OSSOVSKY L. et SACHS L.
Temperature sensitivity of polyoma virus induction of cellular DNA synthesis and multiplication of transformed cells at high temperature
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1967 (58, 1938-1943)

196 - OUCHTERLONY O.
Antigen antibody reaction in gel types of reactions in coordinated systems of diffusion
Acta Path. Microbiol. Scand. – 1953 (32, 231)

197 - OZANNE B. et SAMBROOCK J.
Isolation of lines of cells resistant to agglutination by Concanavalin A from 3T3 cells transformed by SV40
Colloque LEPETIT nº 2 " Biologie des virus oncogènes " – 1971 (2, 248-257)

198 - OZANNE B. et SAMBROOCK J.
Binding of radioactively labelled Concanavalin A and wheat germ agglutinin to normal and virus-transformed cells
Nature New Biology – 1971 (232, 156-160)

199 - PARDEE A.B.
Nat. Cancer Inst. Monograph. – 1964 (14, 7)

200 - PAUL S., BROADFOOT M.M. et WALKER P.
Increased glycolytic capacity and associated enzyme changes in BHK 21 cells transformed with polyoma virus
Int. J. Cancer – 1966 (1, 207-218)

201 - PEARSON G. et FREEMAN G.
Evidence suggesting a relationship between polyoma virus-induced transplantation antigen and normal embryonic antigen
Cancer Res. – 1968 (28, 1665-1673)

202 - PERLMANN P., NILSSON H. et LEON M.A.
Inhibition of cytotoxicity of lymphocytes by Concanavalin A in vitro
Science – 1970 (168, 1112-1115)

203 - PERSON D.A. et MARKOWITZ H.
Immunochemical studies of the phytohemagglutinin Concanavalin A
J. Immun. – 1969 (103, 225-231)

204 - PETHICA B.A. et CAMBRAI M.
La structure des membranes biologiques
La Recherche – 1970 (1, 433-440)

205 - PFLUMM M., MOLLIE N., WANG J.L., et EDELMAN G.M.
Conformational changes in Concanavalin A
J. Biol. Chem. – 1971 (246, 4369-4376)

206 - PLOW E.F. et RESNICK H.
Effects of hydroxyl compounds on the interaction of Concanavalin A with polysaccharides
Biochem. Biophys. Acta – 1970 (221, 657-661)

207 - POLICARD A.
La surface cellulaire et son microenvironnement. Rôle dans les aggrégations cellulaires
Editions Masson et Cº – Paris – 1972

208 - POLLACK R.E. et BURGER M.M.
Surface-specific characteristics of a contact-inhibited cell line containing the SV40 viral genome
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1969 (62, 1074-1076)

209 - PORETZ R.D. et GOLDSTEIN I.J.
An examination of topography of the saccharide binding sites of Concanavalin A and the forces involved in complexation
Biochemistry – 1970 (9, 2890-2896)

210 - QUIOCHO F.A., REEKE G.N., BECKER J.W., LIPSCOMB W.N. et EDELMAN G.M.
Structure of Concanavalin A at 4 Å resolution
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 1853-1857)

211 - RABINOWITZ Z. et SACHS L.
Control of the reversion of properties in transformed cells
Nature – 1970 (225, 136-139)

212 - RABSON A.S. et LEGALLAIS F.Y.
Cytopathogenic effect produced by polyoma virus in cultures of milk adapted murine lymphoma cells (strain P 388 D1)
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1959 (100, 229-233)

213 - RAPP F.
Viral oncogenesis in " Methods in Cancer Research "
1967 (9, 451-510)

214 - REEDER W.J. et EKSTEDT R.D.
Study of the interaction of Concanavalin A with staphylococcal teichoic acids
J. Immunol. – 1971 (106, 334-340)

215 - RILLEY V. et CRAMER R.
Chromatography of SE polyoma virus hemagglutinin
Virology – 1962 (14, 286-287)

216 - ROBERTSON H.T. et BLACK P.H.
Changes in surface antigens of SV40 virus transformed cells
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1969 (130, 363-370)

217 - ROWE W.P., HARTLEY J.W., BRODSKY I. et HUEBNER R.J.
Complement fixation with mouse tumor virus (SE polyoma virus)
Science – 1958 (128, 1339-1340)

218 - SACHS L.
A theory on the mecanism of carcinogenesis by small deoxyribonucleic acid tumor virus
Nature – 1965 (207, 1272-1275)

219 - SACHS L. et MEDINA D.
In vitro transformation of normal cells by polyoma virus
Nature – 1961 (189, 457-458)

220 - SAMBROOCK J., WESTPHAL H., SRINIVASAN P.R. et DULBECCO R.
The integrated state of viral DNA in SV40-transformed cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1968 (60, 1288-1295)

221 - SCHUSTER J.
Les virus du groupe Papova
Biologie Médicale – 1966 (55, 135-218)

222 - SCHWARTZ H.J., LEON M.A. et PELLEY R.P.
Concanavalin A-induced release of skin-reactive factor from lymphoid cells
J. Immun. – 1970 (104, 265-268)

223 - SCHWARTZ H.J. et WILSON F.
Target cell destruction in vitro by Concanavalin A - stimulated lymphoid cells
Amer. J. Path. – 1971 (64, 295-304)

224 - SELA B.A., LIS H., SHARON N. et SACHS L.
Different locations of carbohydrate containing sites in the surface membrane of normal and transformed mammalian cells
J. Memb. Biol. – 1970 (3, 267-279)

225 - SHEININ R.
Deoxyribonucleic acid synthesis in cells replicating polyoma virus
Virology – 1966 (28, 621-632)

226 - SHEININ R., ONODERA K., YOGEESWARAN G. et MURRAY R.K.
Studies of components of the surface of normal and virus-transformed mouse cells
Colloque LEPETIT n^{o} 2 "Biologie des virus oncogènes" – 1971 (2, 274-280)

227 - SHOHAM J., INBAR M. et SACHS L.
Differential toxicity on normal and transformed cells in vitro and inhibition of tumor development in vivo by Concanavalin A
Nature – 1970 (227, 1244-1246)

228 - SIVAK A. et MOSCONA A.A.
Agglutinin interaction with embryonic and adult cell surfaces
Science – 1971 (173, 264-265)

229 - SO L.L.
Protein-carbohydrate interaction. The interaction of Concanavalin A with alpha-mannans from a variety of microorganisms
J. Biol. Chem. – 1968 (243, 2003-2007)

230 - SO L.L. et GOLDSTEIN I.J.
Protein-carbohydrate interaction. Application of the quantitative hapten inhibition technique to polysaccharide Concanavalin A interaction. Some comments on the forces involved in Concanavalin A-polysaccharide interaction
J. Immun. – 1967 (99, 158-163)

231 - SO L.L. et GOLDSTEIN I.J.
Protein-carbohydrate interaction · Application of the quantitative precipitin method to polysaccharide-Concanavalin A interaction
J. Biol. Chem. – 1967 (242, 1617-1622)

232 - SO L.L. et GOLDSTEIN I.J.
Protein-carbohydrate interaction. On the number of combining sites on Concanavalin A, the phytohemagglutinin of the Jackbean
Biochem. Biophys. Acta – 1968 (165, 398-404)

233 - STANNERS C.P. et TILL J.E.
Studies on the transformation of hamster embryo cells in culture by polyoma virus. Selected techniques for the detection of transformed cells
Virology – 1963 (21, 464-476)

234 - STANNERS C.P. et TILL J.E.
Studies on the transformation of hamster embryo cells in culture by polyoma virus
Virology – 1963 (21, 436-463)

235 - STANTON M.F. et STEWART S.E.
Oncogenic effect of tissues-culture preparations of polyoma virus in fetal mice
J. Nat. Cancer Inst. – 1959 (23, 1441-1475)

236 - STAVY L., TREVES A.J. et FELDMANN M.
Concanavalin A : effect on lymphocyte-mediated cytotoxicity
Nature – 1971 (232, 56-58)

237 - STEWART S.E.
Leukemia in mice produced by a filtrable agent present in AkR leukemic tissues with notes on a sarcoma produced by the same agent
Anat. Record. – 1953 (117, 532-540)

238 - STEWART S.E. et EDDY B.E.
The induction of neoplasms with a substance released from mouse tumors by tissue culture
Virology – 1957 (3, 380-400)

239 - STEWART S.E. et EDDY B.E.
Influence of age on tumor induction in mice and hamsters injected with tumor agent carried in tissue culture
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. – 1958 (2, 348-349)

240 - STEWART S.E. et EDDY B.E.
Tissue culture plaques of SE polyoma virus
Proc. Am. Assoc. Cancer Res. – 1959 (3, 67-72)

241 - STEWART S.E., EDDY B.E. et BORGESE N.G.
Neoplasm in mice inoculated with a tumor agent carried in tissue culture
J. Nat. Cancer Inst. – 1958 (20, 1223-1242)

242 - STOKER M.
Characteristics of normal and transformed clones arising from BHK 21 cells exposed to polyoma virus
Virology – 1962 (18, 649-651)

243 - STOKER M.
Abortive transformation by polyoma virus
Nature – 1968 (218, 234-238)

244 - STOKER M. et ABEL P.
Conditions affecting transformation by polyoma virus
Cold Spring Harbor Symposium on quantitative biology – 1962 (27, 375-386)

245 - STOKER M. et MAC PHERSON I.A.
Studies on transformation of hamster cells by polyoma virus in vitro
Virology – 1961 (14, 359-370)

246 - STOKER M. et MAC PHERSON I.A.
Syrian hamster fibroblast cell line BHK21 and its derivatives
Nature – 1964 (203, 1355-1357)

247 - SUMNER J.B.
J. Biol. Chem. – 1919 (37, 137)

248 - SUMNER J.B., GRALEN N. et ERICKSON-QUENSEL I.B.
The molecular weights of Canavalin, Concanavalin A and Concanavalin B
J. Biol. Chem. – 1938 (125, 45-52)

249 - SUMNER J.B. et HOWELL S.F.
The identification of the hemagglutinin of the Jackbean with Concanavalin A
J. Bacteriol – 1936 (32, 227-237)

250 - SUMNERS J. et VOGT M.
Recovery of virus from polyoma-transformed BHK21 cells
Colloque LEPETIT nº 2 " Biologie des virus oncogènes " – 1971 (2, 306-309)

251 - TAKEMOTO K.K., MALMGREEN R.A. et HABEL K.
Heat-labile serum factor required for immunofluorescence of polyoma tumor antigens
Science – 1966 (153, 1122-1123)

252 - TAKEMOTO K.K., MALMGREEN R.A. et HABEL K.
Immunofluorescent demonstration of polyoma tumor antigen in lytic infection of mouse embryo cells
Virology – 1966 (28, 485-488)

253 - TAYLOR-PAPADIMITRIOU J., STOKER M. et RIDDLE P.
Further manifestations of abortive transformation of BHK21 cells by polyoma virus
Int. J. Cancer – 1971 (7, 269-276)

254 - THOMAS M. et LE BOUVIER G.
Transformation of bovine cell cultures by preparations of polyoma virus
J. Gen. Virol. – 1967 (1, 125-130)

255 - THORNE H.V.
Detection of size heterogeneity in the supercoiled fraction of polyoma virus DNA
J. Mol Biol. – 1968 (35, 215-226)

256 - TING R.C.
Failure to induce transplantation resistance against polyoma tumor cells with syngenic embryonic tissues
Nature – 1968 (217, 858-859)

257 - TODARO G.J. et GREEN H.
High frequency of SV40 transformation of mouse cell line 3T3
Virology – 1966 (28, 756-759)

258 - VOGT P.K.
The cell surface in tumor-virus infection
Cancer Res. – 1963 (23, 1519-1527)

259 - VOGT M.
Induction of virus multiplication in 3T3 cells transformed by a thermosensitive mutant of polyoma virus
J. Mol. Biol. – 1970 (47, 307-316)

260 - VOGT M. et DULBECCO R.
Virus-cell interaction with a tumor producing virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1960 (46, 365-370)

261 - VOGT M. et DULBECCO R.
Steps in the neoplastic transformation of hamster embryo cells by polyoma virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1963 (49, 171-179)

262 - VOGT M., DULBECCO R. et SMITH B.
Induction of cellular DNA synthesis by polyoma virus. Induction in productively infected cells
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1966 (55, 956-960)

263 - WANG J.L., CUNNINGHAM B.A. et EDELMANN G.M.
Unusual fragments in the subunit structure of Concanavalin A
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 1130-1134)

264 - WECKSER M.
Mitogenic effects of extracts of Canavalia ensiformis and Concanavalin A
Acta Cientifica Venezolana – 1968 (19, 154-156)

265 - WEIL R.
A quantitative assay for a subviral infective agent related to polyoma virus
Virology – 1961 (14, 46-53)

266 - WEIL R. et HANCOCK R.
Le virus polyome, moyen d'étude de la régulation génétique dans les cellules de mammifères
Bull. Soc. Vaud. Sc. Nat. – 1970 (70, 365-373)

267 - WEIL R., MICHEL M.R., RUSCHMANN G.K.
Induction of cellular DNA synthesis by polyoma virus
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1965 (53, 1468-1475)

268 - WEISS L.
The cell periphery, metastasis and other contact phenomena
NORTH HOLLAND RESEARCH MONOGRAPHS FRONTIERS OF BIOLOGY – AMSTERDAM – 1967

269 - WEISS L.
The cell periphery
Int. Rev. Cytol. – 1969 (26, 63-105)

270 - WILDY P. et STOKER M.
The fine structure of polyoma virus
Virology – 1960 (11, 444-457)

271 - WILLIAMS R.D. et COULSON A.S.
Lymphocyte transformation in protein-free medium by Concanavalin A
Lancet – 1971 (1, 80)

272 - WILLIAMS J.F. et TILL J.E.
Transformation of rat embryo cells in culture by polyoma virus
Virology – 1964 (24, 505-508)

273 - WINOCOUR E.
Purification of polyoma virus
Virology – 1963 (19, 158-168)

274 - WINOCOUR E.
On the apparent homology between DNA from polyoma virus and normal mouse synthetic RNA
Virology – 1967 (31, 15-28)

275 - WINOCOUR E. et SACHS L.
A plaque assay for the polyoma virus
Virology – 1959 (8, 397-400)

276 - WRAY P. et WALBORG E.F.
Isolation of tumor cell surface binding sites for Concanavalin A and wheat germ agglutinin
Cancer Res. – 1971 (31, 2072-2079)

277 - YARIV J., KALB et LEVITZKI A.
The interaction of Concanavalin A with alpha-methyl-D-glucopyranoside
Biochem. Biophys. Acta – 1968 (163, 303-305)

278 - ZAND R., AGRAWAL B.L. et GOLDSTEIN I.J.
pH-dependant conformationnal changes of Concanavalin A
Proc. Nat. Acad. Sci. USA – 1971 (68, 2173-2176)

279 - ZARLING J.M. et TEVETHIA S.S.
Expression of Concanavalin A binding sites in rabbit kidney cell infected with vaccinia virus
Virology – 1971 (45, 313-316)

280 - ZAMBALA M. et PTAK W.
Localisation of polyoma virus induced tumor complement fixing antigen in proteins fractions of tumor extracts obtained by gel filtration
Acta Virol. – 1968 (12, 157-161)

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION 35

LEXIQUE 37

LA CONCANAVALINE A 41

A - DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES 42

I - DECOUVERTE 43
II - PREPARATION – PURIFICATION 43
III - STRUCTURE ET PROPRIETES PHYSICO CHIMIQUES 45

1) Nature
2) Poids moléculaire
3) Structure moléculaire
4) Interactions avec les métaux
5) Interactions avec les sucres
6) Dénaturation
7) Marquage

IV - PROPRIETES 53

1) Propriétés générales
2) Toxicité
3) Propriétés immunologiques
4) Action sur la phagocytose et la division cellulaire
5) Action sur les tumeurs constituées
6) Action agglutinante sur les cellules transformées
7) Autres propriétés.

B - EXPERIENCES PRELIMINAIRES 61

I - TOXICITE CHEZ L'ANIMAL 62

1) Toxicité locale
2) Toxicité générale

II - PROPRIETES IMMUNOGENES 64
III - ACTION ANTI-TUMORALE DIRECTE 67
IV - ACTION SUR LA TUMORIGENICITE IN VIVO 68

LA LIGNEE CELLULAIRE BHK 21 73

I- ORIGINE 74
II - CARACTERISTIQUES DES CELLULES BHK 21 74
III - MUTANTS DE LA SOUCHE BHK 21 75
IV - CULTURE IN VITRO 76

LE VIRUS POLYOME 81

A - INTRODUCTION 82
B - RAPPEL SUR LES VIRUS DU GROUPE PAPOVA 83
C - PROPRIETES DU VIRUS POLYOME 84

I - DECOUVERTE 85
II - ISOLEMENT – CULTURE IN VITRO 86
III - POUVOIR TUMORIGENE CHEZ L'ANIMAL 86
IV - MORPHOLOGIE ET STRUCTURE – CARACTERES GENERAUX ... 91
1) Structure
2) Caractères généraux
3) Pouvoir hémagglutinant
V - PROPRIETES IMMUNOLOGIQUES 94
1) Les antigènes tumoraux induits par le virus polyome
2) Le pouvoir immunogène
VI - LE GENOME VIRAL 98
VII - INTERACTIONS AVEC LES CELLULES 101
1) Le cycle lytique
2) Le cycle transformant
3) Le cycle abortif

D - METHODES DE PRODUCTION ET DE TITRAGE 112
I - INTRODUCTION 113
II - PRODUCTION DU VIRUS SUR CELLULES DE SOURIS 113
III - TITRAGE DU VIRUS PAR LA METHODE DES PLAGES 114
IV - TITRAGE DU VIRUS PAR LA METHODE D'HEMAGGLUTINATION 115
V - ETUDE DU POUVOIR TRANSFORMANT IN VITRO 115

METHODES DE QUANTIFICATION DE L'ACTION DE LA CONCANAVALINE A 117

A - LES DIFFERENTES METHODES D'ETUDE 118

I - DESCRIPTION 119

1) Méthodes ne faisant pas directement appel à une réaction d'agglutination

2) Méthodes faisant directement appel à une réaction d'agglutination

II - CRITIQUE DE CES METHODES 124

1) Méthodes utilisant la Concanavaline A marquée

2) Tests de consommation

3) Test d'inhibition de la mobilité cellulaire

4) Méthodes automatisées

5) Méthodes d'agglutination classiques

B - La METHODE PROPOSEE 127

I - SES BUTS 129

II - SES BASES : ETUDE FONDAMENTALE DES PARAMETRES INTERVENANT DANS LA REACTION D'AGGLUTINATION CELLULAIRE PAR LES LECTINES 130

1) La réaction d'agglutination en Immunologie

2) La réaction biochimique enzyme-substrat

3) Intérêt de ces modèles

III - DESCRIPTION DE LA METHODE PROPOSEE 148

1) Matériel

2) Temps préparatoires de l'agglutination

3) La technique d'agglutination

4) Expression des résultats : la courbe d'agglutination

5) Exploitation des résultats

6) Signification du coefficient d'agglutinabilité et de l'unité agglutinante

7) Critique de la méthode proposée

ETUDE DE L'AGGLUTINABILITE CELLULAIRE AU COURS DU CYCLE DU VIRUS POLYOME 169

A - INTRODUCTION 170

B - ETUDE DE CELLULES TRANSFORMEES 170

I - LEMATERIEL 170

II - LES RESULTATS 171

1) La courbe d'agglutination
2) Le coefficient d'agglutinabilité
3) La détermination de l'unité agglutinante

C - ETUDE DU CYCLE ABORTIF DU VIRUS POLYOME 175

I - MATERIEL ET METHODES 175

1) Les cellules
2) Le virus
3) La production du cycle abortif
4) La production d'une vague de mitoses

II - RESULTATS 176

1) Cycle abortif en milieu "riche"
2) Cycle abortif en milieu "pauvre"
3) Etude de l'influence de la mitose sur l'agglutinabilité
4) Les témoins

DISCUSSION 187

A - DISCUSSION DE LA METHODE 189

B - THEORIES EXPLICATIVES DE L'AGGLUTINABILITE 190

I - LES SITES DE SURFACE 190

II - NOMBRE DE SITES 199

III - NATURE DES SITES 202

IV - DETERMINISME GENETIQUE 202

C - LE COEFFICIENT D'AGGLUTINABILITE : SA SIGNIFICATION ,SA PLACE PARMI LES AUTRES TESTS DE TRANSFORMATION 203

D - SPECIFICITE DU PHENOMENE 204

I - PAR RAPPORT A LA METHODE 204

II - PAR RAPPORT A LA SOUCHE CELLULAIRE 204

III - PAR RAPPORT AU CYCLE MITOTIQUE 205

IV - PAR RAPPORT AU VIRUS INDUCTEUR 205

V - PAR RAPPORT A LA TRANSFORMATION 206

VI - PAR RAPPORT A LA CONCANAVALINE A 207

E - DISCUSSION DES RESULTATS OBTENUS 208

I - LA TRANSFORMATION STABLE 208
II - LE CYCLE ABORTIF 208

F - AGGLUTINATION ET CYCLE ABORTIF 209

CONCLUSIONS 212

BIBLIOGRAPHIE 214

SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate

Je promets et je jure, au nom de l'Etre Suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobe et méprisé de mes Confrères si j'y manque.

Reprographie Tacussel - Aix et Vitrolles